

TESIS DE DOCTORADO

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN
PHOTOBACTERIUM DAMSELAE SUBSP. *DAMSELAE*: UN PATÓGENO DE
LA ACUICULTURA MARINA**

Vences Lorenzo Ana

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Identificación y caracterización de genes de virulencia en *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*: un patóxeno de la acuicultura marina

D./Dña. Ana Vences Lorenzo

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
- 5) Non hai conflito de interese en relación aos estudos publicados nesta Tese.

En _____ de _____, de _____ de 2018

Asdo.



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE
Identificación y caracterización de genes de virulencia
en *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*: un
patógeno de la acuicultura marina

D./Dna. Carlos Rodríguez Osorio

INFORMA:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D./Dna. **Ana Vences Lorenzo**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

En _____ de _____, de _____ de 2018

Asdo.



El trabajo descrito en la presente memoria ha sido financiado por los siguientes **proyectos competitivos**:

-AGL2012-39274-C02-01 (Ministerio de Economía y Competitividad). Durante la realización de esta tesis se ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) asociada a este proyecto.

-EM 2012/043 (Xunta de Galicia).

-AGL2013-48353-R (Ministerio de Economía y Competitividad).

-AGL2016-79738-R (Ministerio de Economía y Competitividad).

Todos los proyectos arriba mencionados han estado cofinanciados por el programa FEDER de la Unión Europea.

Una parte de este trabajo de tesis se realizó durante una **estancia de 3 meses** (Septiembre-Diciembre de 2016) en la *Johannes Gutenberg Universität*, Mainz (Alemania), bajo la supervisión del Prof. Matthias Husmann.



SUMMARY

The marine pathogenic bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* is considered a primary pathogen for a variety of fish species of importance in marine aquaculture. In addition, it has zoonotic potential as it can cause opportunistic hemorrhagic septicemia in humans that may evolve into a fatal outcome. Recent studies have shown that strains of *P. damsela* subsp. *damsela* exhibiting strong hemolytic activity all harbour a large conjugative virulence plasmid dubbed pPHDD1 (150 Kb). This mobile element encodes two cytotoxins with hemolytic activity: the phospholipase-D damselysin (Dly) and the pore-forming toxin phobalysin P (PhlyP), and the two play a major role in virulence for homeotherm and poikilotherm animals. Notably, pPHDD1 plasmid is restricted to only a fraction of the strains isolated from fish farm outbreaks. Strains lacking pPHDD1 (hereafter dubbed as *plasmidless strains*) exhibit lower hemolytic activity, which is attributable to the chromosome I-encoded pore-forming toxin phobalysin C (PhlyC). Although plasmidless strains are commonly isolated from outbreaks in marine fish farms, no genetic studies aimed at identifying additional virulence factors have been conducted so far in this category of strains.

In the present study, we have demonstrated that PhlyC toxin, encoded in chromosome I, plays a role in virulence for fish and in cytotoxicity for cell lines, in plasmidless *P. damsela* subsp. *damsela* strains. In addition, by combining data from comparative analysis of complete genomes and from analysis of deletion mutants in candidate genes, we have identified two hitherto uncharacterized genes in this subspecies encoding, respectively, a collagenase (ColP) and a phospholipase (PlpV). While *colP* gene is present in only a subset of the isolates analyzed, we found here that *plpV* gene is ubiquitous in the subspecies. Moreover, transposon insertion mutagenesis using mini-Tn10 allowed us to identify *lip80* gene as the responsible for the lipolytic activity exerted by the vast majority of the *P. damsela* subsp. *damsela* isolates on agar plates supplemented with tween 80. In accordance with the prediction of signal peptides within the amino acid sequences of PhlyC, ColP and PlpV, mutants for type II secretion system genes (T2SS) *epsL* and *pilD* showed a strong impairment in

the activities attributable to PhlyC and PlpV, and a partial impairment in the collagenase activity attributable to ColP. These data indicate that these enzymes are secreted via the T2SS. However, the lipolytic activity associated to Lip80 was not affected in the *epsL* and *pilD* mutants indicating that this enzyme is secreted by another pathway. Virulence assays with sea bass as animal model, and cytotoxicity assays using fish and human cell lines, demonstrated that PhlyC, PlpV and ColP contribute to virulence for fish and to cytotoxicity for cell lines, with a major contribution of PhlyC and PlpV and a minor contribution of ColP. Hence, mutants for *hlyA_{ch}* (encoding PhlyC) and *plpV* genes exhibited the major reduction in virulence for fish. Our results confirm the pathogenic potential of plasmidless strains of *P. damsela* subsp. *damsela* and demonstrate the role of PhlyC hemolysin, PlpV phospholipase and ColP collagenase in virulence for sea bass, as well as in toxicity for fish and human cell lines.



AGRADECEMENTOS

Gustárame aproveitar este espazo para darlle as grazas a todas aquelas persoas que directa ou indirectamente axudaron ao desenvolvemento deste traballo:

Ao meu director de tese Carlos Rodríguez Osorio, polo seu gran entusiasmo, comprensión e motivación. Grazas por ser o primeiro en felicitar-me ante os resultados positivos, e o primeiro tamén en animarme ante os negativos. Ao profesor Manuel Luís Lemos Ramos, por darme a oportunidade de iniciarme no mundo da investigación, e ao profesor Matthias Husmann da *Johannes Gutenberg Universität* pola súa acollida durante a miña estancia en Mainz (Alemania).

Aos meus compañeiros de laboratorio e café, xa amigos, para os que só teño palabras de agradecemento e cariño, Mateus, Miguel, Xose, Sol, Gabriel, Marta e Diego. Así coma tamén aos meus compis que xa non están, Amable, Arturo e Bea. Din que rir alonga a vida, grazas a todos vós a miña será máis lonxeva.

Ás compañeiras de viroloxía Sandra e Lucía, por aturar as nosas pintorescas conversas durante as comidas, e Alián pola súa axuda cos cultivos celulares. A Placeres, pola enerxía e alegría que desprende cada día.

Aos meus amigos “Os Johnnies”, a maioría xa dispersos por España e arredores, polos grandes momentos de distracción e motivación, en especial a Bea e Jesús. A Dani, Vicky, Beña, Fani, Noe e Naiara por estar sempre ao meu carón.

Por último, aos máis importantes, á miña familia. A miña nai, muller forte a que aspiro parecerme, por ser a única persoa que nun minuto ao teléfono é capaz de tranquilizarme e animarme. Ao meu pai, polo seu gran apoio ao longo desta etapa e polos seus consellos sobre a vida. Ás miñas irmáns, por ser dous pilares imprescindibles para min e aos meus cuñados polo seu peculiar apoio. A Huguíño, porque cun sorriso del o meu mundo detense.

A todos vós, a miña máis sincera gratitude.



ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS

∃ **pPHDD1**: Cepa portadora del plásmido de virulencia pPHDD1
∄ **pPHDD1**: Cepa carente del plásmido de virulencia pPHDD1
[ATP]: Concentración de ATP celular
AB.9: Línea celular fibroblástica de pez cebra
Amp: Ampicilina
AT: Azul de tripán
CDS: Secuencias codificantes predichas
CC: Licencia Creative Commons
Cm: Cloranfenicol
DMSO: Dimetil sulfoxido
dNTP: Desoxinucleótido 5' trifosfato
DO: Densidad óptica
EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
ECPs: Productos extracelulares bacterianos
EPC: Línea celular epitelial de pez
FALGPA: 2-furanacryloyl-Leu-Gly-Pro-Ala
Gent: Gentamicina
HaCaT: Línea celular de queratinocitos humanos
IPITG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kan: Kanamicina
KDa: Kilodaltons
LB: Medio Luria Bertani
MOI: Multiplicidad de infección
ORF: Marco de lectura abierta (del inglés *open reading frame*)
pb: Pares de bases
PCC: dominio pre-peptidasa C-terminal
PDB: Código de identificación para la base de datos *Protein Data Bank*
pI: Punto isoelectrico
PKD: Dominio similar a la enfermedad renal poliquística
Rif: Rifampicina
TAE: Tampón Tris-EDTA
TCBS: Tiosulfato citrato bilis sacarosa
Tet: Tetraciclina
Tm: Temperatura de fusión
TSA-1: Agar de soja y Triptona +1% NaCl
TSC-1: Caldo de soja y Triptona +1% NaCl
TFP: Toxina formadora de poro
UFC: Unidades formadoras de colonias
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido



1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 La importancia de la acuicultura en la actualidad	9
1.2 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> , patógeno emergente en acuicultura	14
1.3 ¿Quién es <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> ?	17
1.3.1 Posición taxonómica de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	18
1.3.2 Características bioquímicas y morfológicas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	19
1.4 La patogenicidad de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	22
1.4.1 <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> como patógeno de animales poiquiloterms	23
1.4.2 <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> como patógeno de animales homeoterms	25
1.5 Factores de virulencia descritos actualmente en <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	28
1.5.1 Sistemas de adquisición de hierro	29
1.5.2 Citotoxinas con actividad hemolítica: la damselsina Dly y las toxinas formadoras de poro PhlyP y PhlyC	32
1.6 ¿Existen otros factores de virulencia en cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> no portadoras del plásmido virulento pPHDD1?	37
1.6.1 Las fosfolipasas bacterianas y su relación con la patogenicidad	39
1.6.2 Las colagenasas bacterianas y su relación con la patogenicidad	43
1.6.3 Las lipasas bacterianas y su relación con la patogenicidad	46
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo	57
3.2 Extracción de ADN genómico y plasmídico	61
3.3 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR y PCR-SOE)	61
3.4 Clonación de fragmentos de ADN	65
3.5 Electroporación de plásmidos en <i>Escherichia coli</i>	66
3.6 Secuenciación de ADN y herramientas de bioinformática	67
3.6.1 Secuenciación del genoma de las cepas A-162, LD-07 y RM-71	67
3.6.2 Secuenciación clásica o Sanger	67
3.7 Otras herramientas bioinformáticas y bases de datos empleadas	68
3.8 Mutagénesis	69
3.8.1 Obtención de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina	69
3.8.2 Mutagénesis por intercambio alélico	69
3.8.3 Mutagénesis por transposición del mini-Tn10	74
3.8.3.1 Conjugación de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> con mini-Tn10 y activación de la transposasa	74

3.8.3.2 Clonación y secuenciación de las zonas adyacentes al transposón Tn10	74
3.9 Complementación de los mutantes con el gen salvaje	75
3.10 Extracción de productos extracelulares: técnica del celofán	77
3.11 Obtención de sobrenadantes a partir de cultivos bacterianos	78
3.12 Ensayos enzimáticos: hidrólisis de macromoléculas	78
3.12.1 Ensayos de actividad hemolítica	78
3.12.1.1 Medición de la actividad hemolítica en placas de agar sangre	79
3.12.1.2 Medición de la actividad hemolítica a partir de productos extracelulares o sobrenadantes	80
3.12.2 Ensayos de actividad lipolítica	81
3.12.2.1 Ensayos de actividad lipasa/esterasa: hidrólisis de tween 80 y tween 20	81
3.12.2.2 Ensayos de actividad fosfolipasa	82
3.12.3 Ensayos de actividad proteolítica	82
3.12.3.1 Ensayos de actividad caseinasa: hidrólisis de caseína	82
3.12.3.2 Ensayos de actividad gelatinolítica y collagenolítica	83
3.12.3.2.1 Actividad gelatinasa: hidrólisis de gelatina	83
3.12.3.2.2 Actividad collagenasa: hidrólisis del péptido sintético FALGPA	83
3.13 Ensayos de virulencia en lubina	84
3.14 Líneas celulares y condiciones de cultivo	85
3.15 Ensayos de citotoxicidad	86
3.15.1 Microscopía óptica: efectos sobre el tapiz y morfología celulares	86
3.15.2 Ensayos de azul de tripán	86
3.15.3 Ensayos de ATP celular	87
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
4.1 Virulencia y citotoxicidad de las cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> carentes del plásmido de virulencia pPHDD1	93
4.1.1 Comparación del grado de virulencia entre las cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> LD-07 (Δ pPHDD1) y RM-71 (Δ pPHDD1)	94
4.1.2 Comparación de la citotoxicidad entre las cepas LD-07 (Δ pPHDD1) y AR78 (Δ pPHDD1)	97
4.2 Búsqueda de nuevos factores de virulencia: análisis comparativo de cuatro genomas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	99
4.2.1 Características generales de los genomas a estudiar	99
4.2.2 Análisis comparativo de los genomas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	105
4.2.3 Estudio <i>in silico</i> de las ORFs específicas de las cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> carentes del plásmido pPHDD1	114

4.2.3.1 ORFs A9D46_13210/A0J46_15580: colagenasas microbianas	114
4.2.3.2 ORFs A9D46_08245/A0J46_04865: Proteínas de unión a ATP (ATP-binding protein)	117
4.2.3.3 ORFs A9D46_15015/A0J46_16675 y A9D46_15030/A0J46_16690: proteínas de función desconocida	118
4.2.3.4 ORFs A9D46_03250/A0J46_07825 (Proteínas J inducibles por daño al ADN) y proteínas de función desconocida A9D46_03255/A0J46_07830	120
4.2.3.5 ORFs A9D46_09235/A0J46_12460 y A9D46_09230/A0J46_12465: sistema toxina antitoxina ParED	121
4.2.3.6 ORFs A9D46_04550/A0J46_11030 y A9D46_04555/A0J46_11035: proteínas de función desconocida	123
4.3 PhlyC contribuye a la hemólisis y a la virulencia de las cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> carentes de pPHDD1	125
4.3.1 Todos los aislados de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> que son hemolíticos en sangre de cordero, poseen el gen <i>hlyA_{cr}</i>	126
4.3.2 El gen <i>hlyA_{cr}</i> presenta distintos contextos genéticos en los genomas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> estudiados	132
4.3.3 La hemolisina cromosómica PhlyC de LD-07 muestra homología con toxinas formadoras de poro de numerosas especies de la familia <i>Vibrionaceae</i>	133
4.3.4 Estudio <i>in silico</i> de la hemolisina PhlyC de la cepa LD-07 (Δ pPHDD1) de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	136
4.3.5 PhlyC es la responsable de la capacidad hemolítica de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> LD-07 en sangre de oveja y de conejo	144
4.3.6 PhlyC es una toxina termolábil, secretada al medio extracelular a través de un sistema de transporte general	149
4.3.7 PhlyC contribuye a la virulencia de LD-07 (Δ pPHDD1) en lubina	151
4.3.8 Las fobolisinas cromosómicas PhlyC de LD-07 (Δ pPHDD1) y RM-71 (Δ pPHDD1) presentan actividades hemolíticas similares en sangre de oveja	154
4.4 Identificación de la fosfolipasa PlpV y su contribución a la virulencia en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	161
4.4.1 Todos los aislados de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> presentan actividad fosfolipasa	162
4.4.2 Todas las cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> producen una fosfolipasa PlpV codificada en el cromosoma I	165
4.4.3 PlpV muestra homología con fosfolipasas de la familia <i>Vibrionaceae</i> , entre otras	168

4.4.4 PlpV es la enzima responsable de la degradación de fosfolípidos en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> carentes de pPHDD1	173
4.4.5 Análisis <i>in silico</i> de la fosfolipasa PlpV: proteína lipolítica de la familia GDSL	175
4.4.6 PlpV es una fosfolipasa extracelular con carácter termolábil	181
4.4.7 PlpV de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> , ¿una fosfolipasa de tipo A ₂ ?	184
4.4.8 Actividades enzimáticas adicionales de PlpV: capacidad hemolítica	188
4.4.9 PlpV contribuye a la virulencia para lubina, en cepas carentes de pPHDD1	195
4.5 Identificación de la collagenasa ColP y su contribución a la virulencia en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	199
4.5.1 No todos los aislados de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> presentan actividad gelatinasa	199
4.5.2 Todas las cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> con actividad gelatinasa presentan el gen <i>colP</i>	203
4.5.3 ColP muestra homología con collagenasas de la familia <i>Vibrionaceae</i>	206
4.5.4 Análisis <i>in silico</i> de ColP: enzima de la familia de las metaloproteasas M9	208
4.5.5 ColP: collagenasa de clase II responsable de la hidrólisis de gelatina presentada por ciertas cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	217
4.5.6 ColP es una collagenasa termolábil secretada al medio extracelular	220
4.5.7 ColP contribuye a la virulencia en cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> carentes de pPHDD1	223
4.6 Estudio de la actividad lipolítica en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	227
4.6.1 <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> presentan variabilidad en cuanto a su actividad lipolítica en tween 80 y tween 20	227
4.6.2 El gen <i>lip80</i> es el responsable de la hidrólisis de tween 80 en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	230
4.6.2.1 Todas las cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> con actividad lipolítica en tween 80 poseen el gen <i>lip80</i> codificado en el cromosoma I	234
4.6.2.2 Lip80 muestra homología con lipasas de la familia <i>Vibrionaceae</i> , entre otras	238
4.6.2.3 Lip80 es la responsable de la actividad lipolítica detectada en tween 80	239
4.6.2.4 Análisis <i>in silico</i> de la lipasa/esterasa Lip80: ¿una nueva familia de α/β -hidrolasas?	241
4.6.2.5 Lip80, posible lipoproteína anclada en la membrana externa	249

4.6.2.6 La mutación del gen codificante de Lip80 no causa una detectable disminución de la virulencia para lubina de cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> carentes de pPHDD1	251
4.6.3 Búsqueda del gen responsable de la capacidad de hidrolizar tween 20	253
4.6.4 Detección de la actividad lipolítica en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> mediante API ZYM: ¿es Lip80 una esterasa?	256
4.7 Estudio de la citotoxicidad y los efectos en la viabilidad celular, de los factores de virulencia PhlyC, PlpV, y ColP	261
4.7.1 Parámetro morfológico: microscopía óptica	262
4.7.2 Parámetro bioquímico: exclusión del colorante azul de tripán	265
4.7.3 Parámetro metabólico: análisis de la concentración de ATP celular	269
4.7.4 Estudio del posible efecto sinérgico entre la fosfolipasa PlpV y la hemolisina cromosómica PhlyC	274
4.8 Sistema de Secreción Tipo II: Clave para la secreción de los factores de virulencia PhlyC, PlpV y ColP	276
4.8.1 Identificación mediante transposición con mini-Tn10 del SSTII como el responsable de la secreción de PhlyC	277
4.8.2 El sistema general de secreción tipo II está implicado además, en la secreción de la fosfolipasa PlpV y la collagenasa ColP	285
4.8.2.1 Análisis <i>in silico</i> de los péptidos señal de las enzimas extracelulares PhlyC, PlpV, ColP y Lip80	285
4.8.2.2 La secreción de la fosfolipasa PlpV y la collagenasa ColP está mediada por el SSTII	289
4.8.3 ¿Existen otras enzimas secretadas por el SSTII en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> ?	291
4.8.4 ¿Existen otros Sistemas de Secreción en la cepa LD-07 de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> ?	294
4.8.4.1 Búsqueda del Sistema de Secreción tipo I	294
4.8.4.2 Búsqueda del Sistema de Secreción tipo III	295
4.8.4.3 Búsqueda del Sistema de Secreción tipo IV: Pilus tipo IV y pilus tipo IV sensible a manosa	298
4.8.4.4 Búsqueda del Sistema de Secreción tipo V	303
4.8.4.5 Búsqueda del Sistema de Secreción tipo VI	306
5. CONCLUSIONS	313
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	317



INTRODUCCIÓN





1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA EN LA ACTUALIDAD

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), define a la acuicultura como el cultivo de organismos acuáticos animales o vegetales, tanto en zonas costeras como en el interior, que implica un control en el proceso de cría para aumentar las tasas de producción. Esta actividad económica supone no solo una fuente importante de alimento sino también de ingresos y medio de vida para cientos de millones de personas en todo el mundo. La acuicultura ha posibilitado el gran crecimiento de suministro de pescado para el consumo humano de los últimos años, siendo la responsable de proporcionar la mitad de todo el pescado destinado a tal fin (Fig. I.1).



Fig. I.1: Origen del pescado destinado al consumo humano en el año 2015 (Apromar, 2017).

La producción de acuicultura a nivel mundial en 2015 ascendió a 106 millones de toneladas, con un valor de más de 130.380 millones de euros (Apromar, 2017), superando en 12,3 millones de toneladas a la producción mundial de la pesca (Fig. I.2). Tal y como podemos observar en la Tabla I.1A, los principales productores mundiales de acuicultura son países asiáticos, siendo el que encabeza la lista y con valores estratosféricos de producción, China (61.536.375 toneladas). Las tres principales especies producidas en acuicultura actual en China son el alga laminaria japonesa, la carpa china y la ostra japonesa. A continuación nos encontramos con Indonesia (15.649.311 toneladas), seguido de la India (5.238.019 toneladas), Vietnam (3.450.200 toneladas) y Filipinas (2.348.159 toneladas) (FAO, 2016). Si la Unión Europea se considerara como una unidad, su cosecha de acuicultura se

situaría con 1.301.482 toneladas en 9º lugar, entre Noruega y Egipto. En la Unión Europea los principales productos de la acuicultura son pescados y moluscos. La acuicultura de algas, crustáceos y otros invertebrados es muy reducida (Apromar, 2017).

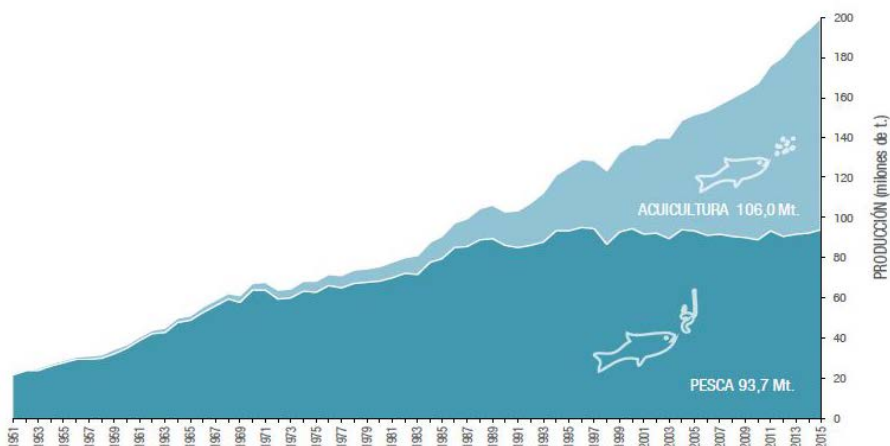


Fig. 1.2: Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo 1951-2015 (Apromar, 2017).

En relación con el valor de sus cosechas en primera venta, los 10 principales países productores de acuicultura a nivel mundial, vieron reducidas sus cifras de 2015 respecto del año anterior con una tasa de variación del -1,8 %, frente al resto de países que lo hicieron al -4,7 %, incrementando la brecha entre ambos grupos también desde esta perspectiva. Con ello, los 10 principales países productores de acuicultura en el mundo produjeron en 2015 por valor del 82,1 % de la cantidad mundial total (130.380 millones de euros) (Tabla I.1B). Debido al más alto valor unitario de las producciones de acuicultura de Chile y Noruega, estos dos países suben muchos puestos en la lista de países productores por valor. En Chile destacan las producciones de salmón Atlántico, mejillones y salmón coho, mientras que en Noruega destacan el salmón Atlántico y la trucha arco iris (FAO, 2016; Apromar, 2017).

1. INTRODUCCIÓN

Tabla I.1: Principales países productores de acuicultura (A) por toneladas anuales y tasa de variación interanual y (B) por valor de la producción anual (millones de euros) y tasa de variación interanual en 2015 (FAO, 2016; Apromar, 2017).

(A)

País	Cantidad (t)	% var. anual
China	61.536.375	4,7%
Indonesia	15.649.311	8,9%
India	5.238.019	7,2%
Vietnam	3.450.200	2,9%
Filipinas	2.348.159	0,5%
Bangladesh	2.060.408	5,3%
Corea del Sur	1.676.489	7,0%
Noruega	1.380.890	3,6%
Egipto	1.174.831	3,3%
Japón	1.103.235	8,0%
TOTAL 10 PRALES. PRODUCTORES	95.617.917	4,2%
RESTO DE LOS PAISES	10.386.267	3,0%
TOTAL MUNDIAL	106.004.184	4,1%
España	289.821	2,7%

(B)

País	Valor (M. euros)	% var. anual
China	289.821	4,8%
India	8.365	-2,9%
Indonesia	7.019	-17,0%
Chile	6.810	7,7%
Vietnam	5.491	-33,4%
Noruega	4.659	-17,5%
Bangladesh	4.120	6,1%
Japón	3.501	-7,8%
Tailandia	1.880	17,4%
Ecuador	1.843	
TOTAL 10 PRALES. PRODUCTORES	107.064	-1,8%
RESTO DE LOS PAISES	23.315	-4,7%
TOTAL MUNDIAL	130.380	-2,4%
España	407	-9,5%

La acuicultura se inició en España en los años 60, centrándose especialmente en la producción de mejillón (Fig. I.3). España ocupa la posición 22ª a nivel mundial, con un crecimiento del 2,7%. Es el Estado miembro de la Unión Europea con una mayor cosecha de acuicultura, con 289.821 toneladas en 2015 (22,3% del total de la Unión), seguido por el Reino Unido con 206.834 toneladas (el 15,9%) y Francia con 206.800 toneladas (15,9 %) (Apromar, 2017). Sin embargo, cuando se considera el valor de la producción, el Reino Unido es el principal Estado miembro productor, con 878,4 millones de euros (24,5% del valor total), seguido por Francia con 653,6 millones de euros (18,2%) y Grecia con 411,1 millones de euros (el 11,4 %). España ocupa la cuarta posición, con 407,2 millones (11,4%), seguida de Italia (Apromar, 2017). Con respecto al valor económico de sus producciones a nivel mundial, España se sitúa en el puesto 31º con un 9,5% menos de valor que en el año 2014 (FAO, 2016; Apromar, 2017).

La principal especie criada en España en 2016 ha sido el mejillón (225.308 toneladas), principalmente en Galicia aunque también se cultiva en Cataluña, Andalucía, Comunidad Valenciana y Baleares; seguido por la lubina (23.445 toneladas) en Murcia, Andalucía, Canarias, Comunidad Valenciana y Cataluña; la dorada (13.740 toneladas) en la Comunidad Valenciana, Murcia, Canarias, Andalucía y Cataluña; y la trucha arco iris (17.732 toneladas), cuyas principales regiones productoras son Castilla y León, Galicia, Andalucía, Cataluña, La Rioja, Castilla la Mancha, Asturias y Aragón (Apromar, 2017).

Otras especies producidas son el rodaballo (7.396 toneladas), siendo Galicia el principal productor; la corvina (1.798 toneladas) principalmente en la Comunidad Valenciana; el atún rojo (940); el lenguado (755 toneladas) cultivado en Galicia y Andalucía; la anguila (315 toneladas) en la Comunidad Valenciana; el besugo, cuya producción en Europa se realiza únicamente en Galicia con una producción de 178 toneladas en 2015; la ostra japonesa con 669 toneladas en 2015, principalmente en Galicia, Cataluña, Andalucía, Asturias, Cantabria y la Comunidad Valenciana; la almeja fina, babosa y japonesa con una producción conjunta de 947 toneladas; y,

desde 2014, está en funcionamiento una granja de abalón localizada en Galicia (Apromar, 2017).

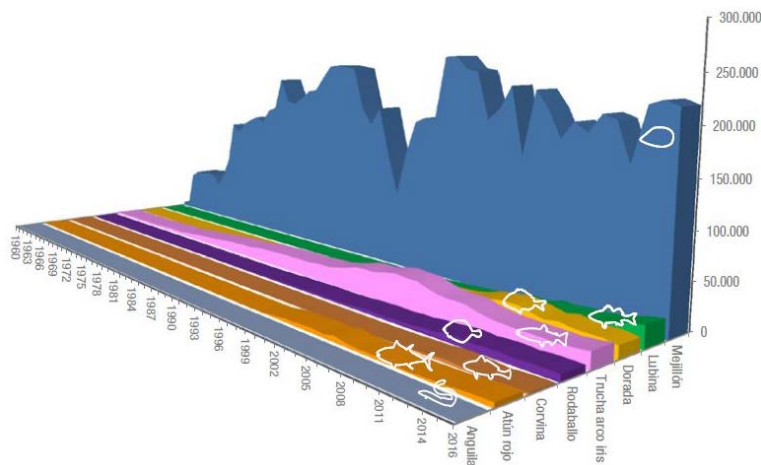


Fig. 1.3: Evolución de la producción de la acuicultura en España, en toneladas por especies entre los años 1960-2016 (Apromar, 2017).

La acuicultura es una actividad económica de larga tradición en España, y de gran relevancia en muchas de sus costas y ríos. Las estadísticas elaboradas por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) estiman un total de 18.076 empleos directos y 45.190 puestos indirectos en la acuicultura marina en España existentes en 2015 (Apromar, 2017). La evolución del empleo en acuicultura en España muestra con los años una tendencia decreciente en cuanto al número de personas empleadas. Sin embargo, las estadísticas medidas en Unidades de Trabajo Anual exponen una situación de estabilidad (Apromar, 2017).

Este sector primario, del que este país es el principal productor en la Unión Europea, está constituido por micro, pequeñas, medianas e incluso grandes empresas. En su conjunto, son organizaciones competitivas, muchas incluso en la vanguardia de la acuicultura en Europa que comercializan sus productos tanto en España como en mercados exteriores. Además, la acuicultura contribuye a la fijación de población en numerosas comarcas españolas, donde llega a ser el principal motor de la economía local, y a la conservación de prácticas tradicionales (Apromar, 2017).

El Plan Estratégico de la acuicultura española establece unos objetivos ambiciosos para la acuicultura española, pasando de las 266.684 toneladas de producción de 2012, a 369.470 toneladas en 2020 y 527.766 toneladas en 2030 (Apromar, 2017). El valor de estas producciones pasaría de los 435 millones de euros de 2012, a 780 millones en 2020 y 1.465 millones en 2030 (Apromar, 2017). A pesar de estimar estas cifras tan atractivas, la acuicultura española sigue enfrentándose a toda una serie de retos tales como i) la necesidad de agilizar los procedimientos administrativos; ii) garantizar el desarrollo y el crecimiento sostenible de la acuicultura a través de la ordenación coordinada del espacio o iii) reforzar su competitividad (Apromar, 2017).

1.2. *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE*, PATÓGENO EMERGENTE EN ACUICULTURA

Una de las cuestiones que afecta de manera más decisiva a la viabilidad del sector de la acuicultura, es la salud de los animales cultivados. Los peces, ya sean de vida libre o de cultivo, son susceptibles a las enfermedades, siendo éstas, más incidentes en la acuicultura que en el medio natural debido a diversos factores tales como una alimentación inadecuada, el estrés causado por la exposición a un factor ambiental extremo o a una sustancia tóxica (altas densidades, temperatura del agua, falta de oxígeno disuelto, manipulación brusca...), o el ataque de organismos patógenos (FAO, 2016).

Las patologías de los peces, aun cuando la mayoría puedan ser inocuas para los seres humanos, pueden tener un efecto devastador sobre las niveles de producción, y por tanto, sobre la economía de las plantas de acuicultura. Es complicado medir las pérdidas anuales sufridas debido a las enfermedades, dada la ausencia de precios de mercado o costes de cosecha marginales (Lafferty *et al.*, 2015), pero sí existen algunas estimaciones (Tabla I.2). Estas cifras se han obtenido durante periodos en los que la industria fue afectada por epidemias agudas, principalmente debidas a enfermedades víricas. Sin embargo, las pérdidas provocadas por enfermedades crónicas, baja

supervivencia y escaso rendimiento, no se consideran como un problema de enfermedad, sino como un coste de producción. El coste de estos tipos de enfermedades es probable que supere el coste de las patologías agudas. El Banco Mundial facilitó en 1997 una estimación de pérdida anual por enfermedades en la acuicultura del orden de 3.000 millones de USD. Por este motivo la sanidad acuícola ocupa un lugar preponderante, siendo necesario poner en práctica procedimientos de prevención y control de las enfermedades que limitan las producciones acuícolas (Alday, 2010).

Tabla I.2: Estimación de las pérdidas debidas a algunas enfermedades víricas en la industria de la acuicultura. Procedente de Alday (2010) (Licencia Creative Commons).

Región	Enfermedad	Años	Pérdidas estimadas (\$)
Asia	Síndrome ulcerante epizóotico	Antes del 1990	Más de 10 millones
Europa Occidental	Virus de la septicemia hemorrágica vírica	Anualmente	60 millones
China	Virus de la mancha blanca	1993	250 millones
India	Virus de la mancha blanca	1994-1995	17,6 millones
Malasia	Virus de la mancha blanca	1995-1999	25 millones
Bangladesh	Virus de la mancha blanca	1995	10 millones
Tailandia	Virus de la mancha blanca	1996	210-250 millones
		1997	600 millones
		1999	280,5 millones
Ecuador	Virus de la mancha blanca	2000	400 millones

Uno de los agentes causantes de pérdidas económicas en la industria acuícola marina, tanto a nivel mundial como en nuestro país, es la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. Este patógeno es responsable de un tipo de vibriosis (Fouz *et al.*, 1992; Labella *et al.*, 2010a), que ha afectado en años anteriores a piscifactorías de diversas partes de España. Además, dada la capacidad de este microorganismo para causar enfermedades infecciosas en el ser humano, se debe prestar mucha atención en el manejo de animales enfermos o de vida libre, previniendo posibles heridas en la piel y la consecuente infección de la herida. Este patógeno marino, ha sido aislado de especies de peces de gran peso en

las producciones acuícolas españolas (Fig. I.4), como el rodaballo en Galicia (*Scophthalmus maximus*; Fouz *et al.*, 1991; Fouz *et al.*, 1992), la lubina en la costa del Mediterráneo cercana a Valencia (*Dicentrarchus labrax*; Botella *et al.*, 2002; Labella *et al.*, 2010a), la dorada en el Mediterráneo (*Sparus aurata*; Vera *et al.*, 1991; Botella *et al.*, 2002; Pujalte *et al.*, 2003; Labella *et al.*, 2010a), así como diversas especies de reciente introducción como el pargo en granjas del sur de España (*Pagrus auriga*; Labella *et al.*, 2006; García-Rosado *et al.*, 2007), el dentón común (*Dentex dentex*; Company *et al.*, 1999) y el sargo en el Mediterráneo (*Diplodus sargus*; García-Rosado *et al.*, 2007).

Asimismo, ha sido documentado su aislamiento en peces cultivados en diversas partes del planeta: truchas arcoíris en Dinamarca (*Oncorhynchus mykiss*; Pedersen *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2009), anguilas en Australia (*Anguilla reinhardtii*, Ketterer & Eaves, 1992), percas gigantes en Tailandia o en Tahiti (*Lates calcarifer*; Renault *et al.*, 1994; Kanchanopas-Barnette *et al.*, 2009), una especie de lenguado (*Cynoglossus semilaevis*; Zhang *et al.*, 2011), y la palometa blanca (*Trachinotus ovatus*; Zhao *et al.*, 2009) en China. Recientemente, *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido aislada de cultivos de lubinas y doradas de las costas egipcia (Abdel-Aziz *et al.*, 2013) y tunecina (Khouadja *et al.*, 2014); así como de lubinas moribundas cultivadas en el Mar Negro turco, coincidiendo con temperaturas del agua cercanas o por encima a los 24 °C (Uzun & Ogut, 2015). Igualmente, este patógeno ha sido encontrado en diversos peces de captura sintomáticos en el Golfo Pérsico (Hassanzadeh *et al.*, 2015), y más recientemente, en cobias cultivadas en India (Sharma *et al.*, 2017).

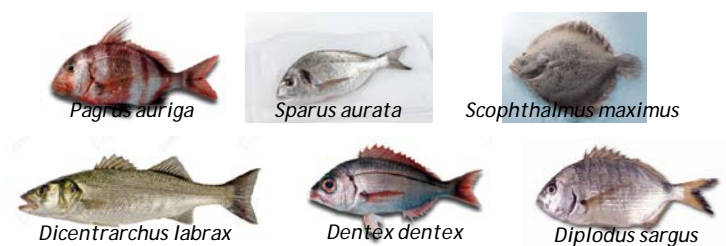


Fig. I.4: Ejemplo de especies de peces de cultivo afectadas por *P. damsela* subsp. *damsela* en España.

La presencia de *P. damsela* subsp. *damsela* en el medio marino, junto con su amplia gama de hospedadores (Fouz *et al.*, 1992), la elevada virulencia que demuestra, la aparición de aislamientos de este patógeno en peces cultivados, y el notable aumento en su distribución geográfica durante los últimos años, causando brotes en países donde nunca se había aislado con anterioridad, hacen que esta bacteria represente una amenaza significativa para los sistemas acuícolas. Debido a esto, este microorganismo es considerado actualmente como un patógeno emergente de origen multiclonal en acuicultura marina (Rodgers & Furones, 1998; Labella *et al.*, 2011; Terceti *et al.*, 2016). Esta bacteria será el objeto de estudio en el presente trabajo.

1.3. ¿QUIÉN ES *PHOTOBACTERIUM DAMSELA* SUBSP. *DAMSELA*?

Photobacterium damsela, es una eubacteria marina Gram negativa que se incluye en la familia *Vibrionaceae*, perteneciente al subgrupo gamma-3 del phylum *Proteobacteria* (Gauthier *et al.*, 1995). Se divide en dos subespecies, *P. damsela* subsp. *damsela* y *P. damsela* subsp. *piscicida* (Fig. 1.5). Anteriormente estas subespecies eran denominadas *Vibrio damsela* y *Pasteurella piscicida*, respectivamente, de modo que se clasificaban en dos familias diferentes (*Vibrionaceae* y *Pasteurellaceae*), dato que pone de manifiesto el amplio rango de características fenotípicas diferenciales entre ambas. Sin embargo, Gauthier *et al.* (1995), a partir de la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S y de ensayos de hibridación ADN-ADN, demostraron que *Vibrio damsela* y *Pasteurella piscicida* eran miembros de una misma especie.

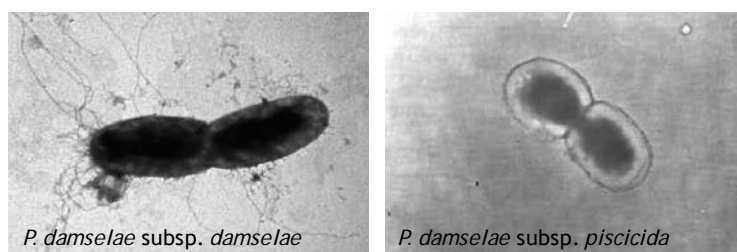


Fig. 1.5: Fotografía mediante microscopía electrónica de transmisión de *P. damsela* subespecie *damsela* y *P. damsela* subespecie *piscicida*.

1.3.1. Posición taxonómica de *P. damsela* subsp. *damsela*

Photobacterium damsela subsp. *damsela* fue aislado por primera vez en el año 1981 a partir de lesiones ulcerosas en la piel de un pez ángel salvaje (*Chromis punctipinnis*), siendo asignado al género *Vibrio* (familia *Vibrionaceae*) bajo el nombre de *Vibrio damsela* (Love *et al.*, 1981). Años más tarde, MacDonell & Colwell (1984) realizaron un estudio filogenético comparando el gen ribosómico 5S de 31 cepas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, con las 11 secuencias de ARNr 5S publicadas hasta aquel momento, proponiendo una reestructuración de la familia y llegando a crear el nuevo género *Listonella*, al que pertenecerían *V. damsela* y *V. anguillarum*, que pasarían a denominarse *Listonella damsela* y *L. anguillara*, respectivamente. Este trabajo no dejó de ser controvertido al haberse incluido en él pocas secuencias de ARNr 5S de especies pertenecientes al género *Vibrio*. Sería en 1991, cuando un estudio comparativo de las características fenotípicas de distintas especies del género *Photobacterium*, como la ausencia de vaina flagelar o la acumulación de PHB (poli- β -hidroxibutirato) durante el crecimiento, llevó a la reasignación de *Listonella damsela* al género *Photobacterium*, pasando a ser denominada *Photobacterium damsela* (Smith *et al.*, 1991).

Con respecto a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, agente causal de la pasteurelosis, su posición taxonómica ha sido objeto constante de controversia. Inicialmente Snieszko *et al.* (1964) la situaron dentro del género *Pasteurella*, en base a sus características morfológicas y bioquímicas, a pesar de ser la única bacteria marina perteneciente a este género así como de no ser capaz de reducir nitratos y presentar tolerancia a valores de temperatura y pH inusuales para miembros de dicho género. Más tarde en 1968, Janssen y Surgalla le otorgaron a este microorganismo el carácter de especie propia, *Pasteurella piscicida*, ya que hallaron suficientes diferencias en propiedades fisiológicas y serológicas con respecto a especies del mismo género. Por otro lado, estudios filogenéticos de la familia *Pasteurellaceae* ya mencionaban una posible incorporación de este especie a la familia *Vibrionaceae* (De Ley *et al.*, 1990), aunque no sería hasta 1995, cuando un estudio comparativo de la secuencia del

ARNr 16S de *Pasteurella piscicida* con secuencias de especies de los géneros *Photobacterium* y *Vibrio*, incorporase definitivamente *Pasteurella piscicida* a la familia *Vibrionaceae* (Gauthier *et al.*, 1995).

Finalmente, debido al elevado nivel de similitud (80%) observado en la hibridación ADN-ADN entre *Pasteurella piscicida* y *Photobacterium damsela*, se las consideró como dos subespecies pertenecientes a una misma especie que se denominó *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, respectivamente (Gauthier *et al.*, 1995).

1.3.2. Características bioquímicas y morfológicas de *P. damsela* subsp. *damsela*

Desde el punto de vista morfológico, *P. damsela* subsp. *damsela* presenta forma bacilar (0,3-0,5 x 1,4-2,6 µm) y es móvil por flagelo polar monotrico (Fig. I.5). Todos los miembros del género *Photobacterium* son móviles, excepto *P. damsela* subsp. *piscicida*, siendo ésta una de las características fenotípicas diferenciales entre las dos subespecies (Tabla I.3).

Bioquímicamente, *P. damsela* subsp. *damsela* se caracteriza por ser una bacteria oxidasa positiva, anaerobia facultativa, sensible al agente vibriostático 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil fosfato de pteridina), que crece en el medio diferencial para vibrios TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa), y es positiva para las pruebas de rojo de metilo y Voges-Proskauer. Además, es positiva para la descarboxilación de arginina y negativa para la descarboxilación de lisina y ornitina (Fig. I.6). Es capaz de fermentar maltosa, manosa y D-glucosa, estando asociada a ésta última la producción de gas. Muestra requerimiento estricto de NaCl, alcanzando tolerancia de hasta el 6, e incluso el 8% (Fouz *et al.*, 1992; Abdel-Aziz *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2006). Presenta unos rangos de temperatura de crecimiento amplios, que van desde los 12 °C a los 37 °C, rango que disminuye en la subsp. *piscicida*, cuyas temperaturas de crecimiento oscilan entre los 15 y 30 °C. Cabe destacar que un estudio de Botella *et al.* (2002), reveló la capacidad de varias cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* aisladas de lubinas y doradas de crecer a 4 y 40 °C.



Fig. 1.6: Resultado de la identificación bioquímica de la cepa LD-07 de *Photobacterium damsela subsp. damsela* utilizando el sistema API 20E.

Desde el punto de vista serológico, a pesar de las homologías halladas por Smith *et al.* (1991) y Fouz *et al.* (1992), los estudios de Fouz *et al.* (1997) mostraron la elevada diversidad serológica de esta bacteria marina, confirmando la presencia de cuatro serogrupos diferentes, así como de distintos patrones de proteínas de membrana con masas moleculares que oscilaban entre 20 y 90 KDa.

Con respecto a las actividades enzimáticas, esta bacteria sintetiza toda una serie de enzimas degradativas, tales como: lipasa, amilasa, ureasa, quitinasa, fosfolipasa, condroitinasa, hialuronidasa y hemolisinas. También se llegó a detectar actividad acetilcolinesterasa en la cepa tipo CIP 102761 (Pérez *et al.*, 1998). Es necesario resaltar que los valores de estas actividades no son los mismos en todas las cepas, estando incluso ausentes, una o varias de ellas, en algunos de los aislados. Actividades enzimáticas que son variables dependiendo de la cepa son: gelatinasa (Grimes *et al.*, 1984a; Vera *et al.*, 1991; Song *et al.*, 1993; Fouz *et al.*, 1993; Pedersen *et al.*, 1997; Labella *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2011), lipasa (Pedersen *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2009; Labella *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2011), amilasa (Labella *et al.*, 2010a) y ureasa (Thyssen *et al.*, 1998; Botella *et al.*, 2002). Incluso se han detectado un par de cepas con actividad caseinasa, carácter considerado como negativo para esta especie (Khouadja *et al.*, 2014). Esta variabilidad genética está apoyada por

1. INTRODUCCIÓN

los análisis realizados mediante técnicas como AFLP, que dio como resultado 24 perfiles distintos en 33 cepas estudiadas, con un 45% de similitud (Botella *et al.*, 2002); y por estudios de tipificación basados en técnicas de PCR empleadas en los estudios epidemiológicos, como RAPD, ERIC-PCR y REP-PCR (Labella *et al.*, 2010b).

Como ya se ha mencionado anteriormente, *P. damsela* subsp. *damsela* manifiesta con respecto a la subespecie *piscicida*, diferencias fenotípicas importantes a la hora de distinguir entre las dos subespecies (Tabla I.3). Destacan la motilidad flagelar, la actividad ureasa, la hemólisis de eritrocitos de cordero, y la capacidad de crecer a 37 °C, características todas ellas positivas solo en la subespecie *damsela*.

Tabla I.3: Principales caracteres fenotípicos diferenciales entre *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. (V) color verde en medio TCBS.

Carácter	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
Movilidad	+	-
Nitrato reductasa	+	-
Tinción bipolar	-	+
Gas de glucosa	+	-
Ureasa	+	-
Lipasa	+	-
Amilasa	+	-
Crecimiento en TCBS	+ (v)	-
Crecimiento en 5% de NaCl	+	-
Producción de ácido de maltosa	+	-
Crecimiento a 37 °C	+	-
Diversidad serológica	Sí	No
Hemólisis de eritrocitos de:		
cordero	+	-
trucha	+	+
Hospedador:		
	Peces	Peces
	Moluscos	
	Crustáceos	
	Reptiles	
	Mamíferos	
	Ser humano	

1.4. LA PATOGENICIDAD DE *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE*

Definimos patogenicidad como la propiedad variable de un patógeno (microbio capaz de causar daño a un hospedador), que puede ser modulada por la susceptibilidad y resistencia del hospedador, así como por el contexto y naturaleza de la interacción hospedador-microorganismo,

causando como resultado daño al hospedador (Casadevall & Pirofski, 1999). La patogenicidad suele ser una característica multifactorial que implica una interacción compleja entre el hospedador y el patógeno (Fig. I.7). Varios factores del hospedador, incluyendo edad, sexo y estado del sistema inmune, afectan al resultado de la interacción hospedador-patógeno

(Bouzid *et al.*, 2013). Además, es necesario tener en cuenta que las características genóticas y fenotípicas del patógeno también definen la diversidad intrínseca en la patogenicidad de los aislados (Fig. I.7).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* es una bacteria marina ampliamente distribuida en todo el mundo, considerada como patógeno primario de una gran variedad de especies marinas de vida libre o de acuicultura. Además, esta especie ha sido aislada de varios ambientes tales como estuarios, agua de mar, sedimentos y animales acuáticos sanos (Buck, 1990; Ghinsberg *et al.*, 1995). Este microorganismo puede sobrevivir en agua de mar y en los sedimentos durante largo tiempo, manteniendo su infectividad y propiedades patogénicas intactas (Ghinsberg *et al.*, 1995; Fouz *et al.*, 1998; Fouz *et al.*, 2000). De hecho, se ha demostrado que las cepas virulentas de *P. damsela*

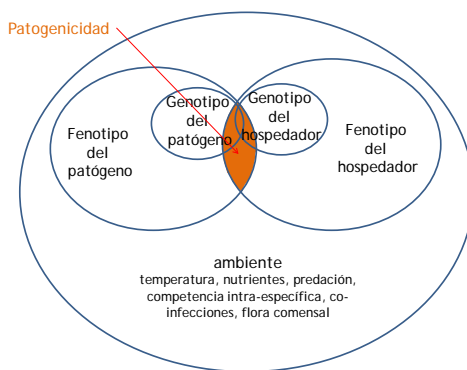


Fig. I.7: Diagrama de Venn que muestra las interacciones que facilitan el inicio de un proceso infeccioso. Gráfico elaborado a partir de la información disponible en Méthot & Alizon (2014).

subsp. *damselae* pueden sobrevivir en condiciones de inanición en el agua de mar durante periodos prolongados de tiempo, y aún así mantener su infectividad para peces (Fouz *et al.*, 1998), hecho por el que se considera que el ecosistema acuático actúa de reservorio, tanto de las cepas virulentas como de las avirulentas (Fouz *et al.*, 1998).

Generalmente, los brotes infecciosos ocasionados por este patógeno presentan una distribución estacional coincidiendo con las épocas de mayor temperatura del agua de mar, y con una menor resistencia del sistema inmune del hospedador (a causa de los cambios fisiológicos que experimentan durante su madurez sexual) (Austin, 2010), siendo más abundantes estos brotes durante los meses de verano (Alvarez *et al.*, 2006). Los resultados de las infecciones experimentales por inmersión, demostraron que este patógeno infecta anguilas y rodaballos a través del agua, induciendo una enfermedad mortal en ellos cuando la temperatura del agua supera los 22 °C (Fouz *et al.*, 2000). Estos resultados están en consonancia con los datos de campo, ya que los brotes epizooticos se produjeron después de un aumento de temperatura de 22 a 25 °C (Fouz *et al.*, 1992), apoyando la hipótesis de una distribución estacional de la incidencia natural de la enfermedad, coincidiendo con temperaturas cálidas (Love *et al.*, 1981, Fouz *et al.*, 1992; Ghinsberg *et al.*, 1995). Hay datos publicados que indican que esta forma de propagación (a través del agua) depende de la temperatura y la salinidad del medio, y que los brotes ocurren con más frecuencia en aguas saladas con temperaturas que oscilan entre los 22 y 25 °C (Fouz *et al.*, 2000). Debido al incremento de la temperatura media de los océanos, como consecuencia del calentamiento global que está experimentando nuestro planeta, es posible llegar a registrar en un futuro un aumento en el número de casos infecciosos producidos por este patógeno.

1.4.1.P. *damselae* subsp. *damselae* como patógeno de animales poiquilotermos

P. damsela subsp. *damsela* fue aislado por primera vez en 1981, a partir de úlceras en la piel de un pez ángel (*Chromis punctipinnis*) en las aguas templadas del sur de California (Love *et al.*, 1981). Como se ha indicado anteriormente, con el paso de los años, han sido

numerosas las cepas de este microorganismo aisladas no solo de animales de cultivo, sino también de diversos animales marinos de vida libre o en cautividad. Ejemplos son, reptiles como la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*; Obendorf *et al.*, 1987), moluscos como el pulpo (*Octopus joubini*; Hanlon *et al.*, 1984) y bivalvos (García Cortés & Antillon, 1990), el tiburón nodriza (*Orectolobus ornatus*; Pedersen *et al.*, 1997), u otras especies de tiburón (*Carcharhinus plumbeus*, *Squalus acanthias*; Grimes *et al.*, 1984a, Grimes *et al.*, 1984b) y rayas (*Dasyatis pastinaca*; Pedersen *et al.*, 1997). Incluso es patógena para crustáceos como los langostinos (*Penaeus monodon*; Song *et al.*, 1993; Vaseeharan *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2016). Además, numerosas cepas han sido aisladas de animales marinos aparentemente sanos, como diversas especies de peces (Serracca *et al.*, 2011; Chiu *et al.*, 2013) o bivalvos (Lozano-León *et al.* 2003). Por otro lado, *P. damsela* subsp. *damsela* se considera un miembro común de la microbiota natural de algunas especies de tiburones (Grimes *et al.*, 1985).

La ruta de entrada de *P. damsela* subsp. *damsela* en el hospedador está poco clara. Hay pruebas sólidas de que las lesiones cutáneas preceden las infecciones de dicho patógeno (Rivas *et al.*, 2013a), empleando la piel como zona de entrada, ya que puede resistir la acción bactericida del mucus de la misma y adherirse a él (Fouz *et al.*, 2000). Curiosamente, gracias a estudios experimentales de infección, se sabe que las cepas virulentas por vía intraperitoneal son también infecciosas a través del agua (Fouz *et al.*, 2000).

Los signos externos más destacables que ocasiona *P. damsela* subsp. *damsela* en peces son: presencia de hemorragias alrededor de la boca, ano, ojos y en la base de las aletas, distensión abdominal, y en algunos casos presencia de úlceras cutáneas (Fig. I.8). Con respecto a los signos internos, lo común es observar acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal y, en algunos casos, hígado con apariencia pálida y abundantes petequias hemorrágicas (Fouz *et al.*, 1991; Fouz *et al.*, 1992). Además, los signos clínicos observados tras la inyección experimental en peces, tanto de células bacterianas vivas como de sus productos extracelulares (Fouz *et al.*, 1992; Fouz *et al.*, 1993), son similares a los descritos en la enfermedad natural causada

por este microorganismo en rodaballo (Fouz *et al.*, 1992). De este resultado se puede extraer la conclusión de que, si bien algunos de los cambios observados en los órganos internos puedan atribuirse a daños mecánicos (causados por las bacterias durante la invasión y proliferación), los principales agentes de los cambios histológicos producidos por *P. damsela* subsp. *damsela* en rodaballo, son las toxinas secretadas (Fouz *et al.*, 1995).

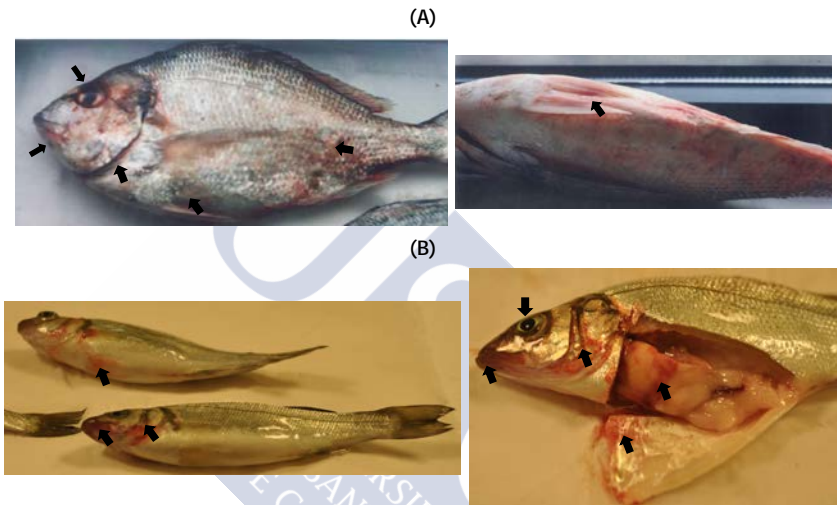


Fig. 1.8: Signos externos e internos en dorada (A) y lubina (B) por una infección de *P. damsela* subsp. *damsela*. Se indican hemorragias alrededor de la boca, ojo, opérculo, aletas, hígado y musculatura interna.

1.4.2. *P. damsela* subsp. *damsela* como patógeno de animales homeotermos

Tal y como ya se ha comentado, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* es capaz de crecer a una temperatura de 37 °C, hecho que se refleja en la capacidad de este microorganismo para afectar a especies homeotermas, tales como ballenas (*Balaenoptera edeni*; Buck *et al.*, 1991) y delfines (*Tursiops truncatus*, *Delphinus delphis* y *Stenella coeruleoalba*; Fujioka *et al.*, 1988; Casaloni *et al.*, 2014). Incluso se ha llegado a aislar de delfines aparentemente sanos (*Tursiops truncatus*; Buck *et al.*, 2006).

Es necesario resaltar que esta bacteria marina también es capaz de infectar al ser humano. Este patógeno fue aislado por primera vez

como agente causal de un caso infeccioso registrado en seres humanos, en 1971 (Morris *et al.*, 1982). La mayoría de las infecciones por *P. damsela* subsp. *damsela* en seres humanos, tienen su origen primario en heridas expuestas a agua de mar o salobre, infligidas durante el manejo de pescado o por aparejos de pesca (Tabla I.4). También se ha dado algún caso por infección después de la ingesta de marisco crudo (Kim *et al.*, 2009a), por exposición al agua de mar a través del tracto urinario (Alvarez *et al.*, 2006), o por heridas ocasionadas por la quilla de un barco (Hundenborn *et al.*, 2013).

En seres humanos, *P. damsela* subsp. *damsela* puede causar una variante extrema de fascitis necrotizante severa, llegando a ser la administración de antibióticos un tratamiento incapaz de controlar la progresión de la infección, resultando mortal en algunos casos (Tabla I.4). Algunos autores, apuestan por la amputación de la extremidad afectada, como tratamiento eficaz para la supervivencia de los pacientes en estadios tempranos de la infección (Goodell *et al.*, 2004) (Fig. I.9). Aunque se han detectado casos en pacientes completamente sanos, gran parte de los cuadros clínicos causados por este patógeno tienen lugar en pacientes que presentan algún tipo de enfermedad (diabetes, cirrosis o afecciones cardíacas) (Tabla 4.1). Destaca el hecho de que la mayoría de los casos hayan ocurrido en áreas costeras cálidas de los Estados Unidos de América, Australia y Japón (Tabla I.4).



Fig. I.9: Lesiones externas de casos clínicos humanos causados por *P. damsela* subsp. *damsela*. Fotografías procedentes de Nakamura *et al.* (2008) (con permiso de John Wiley & Sons) y Hundenborn *et al.* (2013) (CC).

Tabla I.4: Casos clínicos de infecciones producidas por *P. damsela* subsp. *damsela*. (SD) sin datos disponibles.

Paciente	Procedencia	Modo de infección	Historial clínico	Resultado	Referencia y fecha
6 casos	SD	Heridas expuestas a agua marina	Individuos sanos	SD	Morris et al. (1982)
Hombre de 61 años	USA	Herida manipulando pez gato	Pancreatitits y diabetes	Muerte	Clarridge & Zigelboim - Daum (1985)
Hombre de 38 años	USA	Herida manipulando peces	Individuo sano	Infección necrotizante	Coffey et al. (1986)
SD	Australia	Herida infecciosa	SD	SD	Dryden et al. (1989)
Hombre de 62 años	Sudeste asiático	Herida manipulando <i>Siganus vulpinus</i>	Individuo sano	Muerte (fascitis necrotizante)	Yuen et al. (1993)
Hombre de 70 años	USA	Herida manipulando peces	Individuo sano	Muerte (septicemia)	Pérez-Tirse et al. (1993)
Hombre de 63 años	SD	SD	Diabetes y cirrosis	SD	Shin et al. (1996)
Hombre de 64 años	USA	Herida por anzuelo	Enfermedad cardíaca	Muerte (fallo múltiple)	Fraser et al. (1997)
SD	SD	SD	SD	Fascitis necrotizante	Tang & Wong (1999)
Hombre de 43 años	USA	Herido manipulando raya	SD	Fascitis necrotizante	Barber & Swygert (2000)
Hombre de 69 años	Reino Unido	SD	SD	Muerte (fallo múltiple)	Goodell et al. (2004)
Hombre de 58 años	Japón	Pescando	Diabetes	Muerte (fascitis necrotizante)	Asato & Kanaya (2004)
Hombre de 76 años	Japón	Pescando	Individuo sano	Muerte (fallo múltiple)	Yamane et al. (2004)
Niño	Jamaica	SD	Anemia falciforme	SD	Knight-Madden et al. (2005)
Mujer de 22 años	USA	SD	Embarazada	Infección urinaria	Alvarez et al. (2006)
Hombre de 68 años	Japón	Herida de arpón	Diabetes	Fascitis necrotizante	Nakamura et al. (2008)
Chico de 14 años	USA	Herida practicando surf	SD	Septicemia	Aigbivbalu & Maraqa (2009)
Hombre de 46 años	USA	Ingestión oral	Cirrosis	Septicemia y posterior muerte por fallo hepático	Kim et al. (2009a)
Hombre de 64 años	Australia	Lesión en tibia por una quilla	Individuo sano	Herida infecciosa	Hundenborn et al. (2013)

1.5. FACTORES DE VIRULENCIA DESCRITOS ACTUALMENTE EN *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE*

La visión tradicional de la evolución de la virulencia, considera la interacción entre las bacterias patógenas y sus hospedadores pluricelulares como la principal fuerza impulsora para desarrollar rasgos de virulencia que confieren ventajas adaptativas para la transmisión o el crecimiento bacteriano durante la infección. Sin embargo, las bacterias han existido durante más de 3.000 millones de años y se han adaptado a una enorme diversidad de ambientes, mucho antes de que aparecieran organismos pluricelulares, hace unos 600 millones de años. Por lo tanto, para los patógenos bacterianos que tienen un estado de vida libre, la selección de rasgos asociados con la virulencia puede haber ocurrido en ambientes diferentes al de la infección, si proporcionan una ventaja para la supervivencia en su entorno natural de manera que la virulencia para organismos multicelulares podría ser una coincidencia (Flores-Díaz *et al.*, 2016).

La virulencia es el grado o medida de patogenicidad que tienen los microorganismos (Casadevall & Pirofski, 2001). La virulencia de una bacteria viene determinada, en parte, por la posesión de diferentes factores de virulencia. Los factores de virulencia son características genéticas, bioquímicas o estructurales, que le permiten a un organismo producir enfermedad en un hospedador (Fig. I.10). Los factores de virulencia están implicados en la adhesión, colonización, invasión y evasión del sistema inmune del hospedador. La expresión en mayor o menor grado de los diferentes factores de virulencia, determina la variabilidad entre cepas y la mayor o menor virulencia de una cepa concreta, por lo que puede considerarse la virulencia como un carácter cuantitativo.

Podemos considerar factores de virulencia requeridos, aquellos que confieren capacidad para causar enfermedad (por ejemplo, toxinas y cápsula), y por tanto sirven para discriminar patógenos de no patógenos. Por el contrario, los factores de virulencia contributivos, (proteasas y lipasas), son aquellos que modifican la magnitud y extensión de la enfermedad (Casadevall & Pirofski, 2001). Por otro lado, también podemos clasificar los factores de virulencia en: aquellos que promueven la colonización y la invasión del organismo

hospedador (flagelo, sistemas de captación de hierro, enzimas proteolíticas y lipolíticas, componentes de la cápsula y superficie celular, factores de adherencia, colonización e invasión); y aquellos que causan un daño directo a las células del organismo hospedador (exotoxinas) (Salyers & Whitt, 1994). Los factores de virulencia bacterianos pueden estar codificados en el cromosoma, en ADN de bacteriófagos, en plásmidos o en islas de patogenicidad (Peterson, 1996). A continuación resumiremos los principales factores de virulencia descritos hasta la fecha en el patógeno marino *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

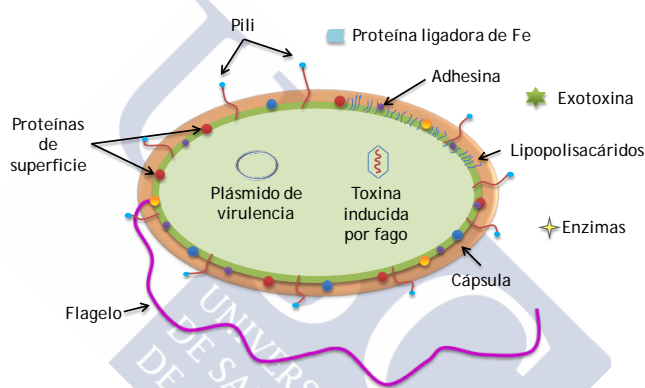


Fig. 1.10: Factores de virulencia presentes en la mayoría de las bacterias patógenas Gram negativas.

1.5.1. Sistemas de adquisición de hierro

Uno de los factores demostrados que aumenta la virulencia para peces y mamíferos de *P. damsela* subsp. *damsela*, es la disponibilidad de hierro (Fouz *et al.*, 1994; Rivas *et al.*, 2013a). El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los organismos vivos, incluyendo las bacterias, dado que actúa como regulador de muchos procesos celulares, metabólicos y biosintéticos (Saha *et al.*, 2013). Aunque es uno de los elementos más abundantes en la Tierra, en condiciones aerobias y pH neutro como los hábitats marinos la biodisponibilidad del hierro es escasa, ya que se encuentra principalmente en la forma férrica oxidada (Fe^{3+}) insoluble. Además, cuando el hierro está presente en la forma reducida (Fe^{2+}), activa la

reducción parcial del oxígeno a radicales hidroxilo que son deletéreos. Por lo tanto, no hay prácticamente hierro libre en los organismos, estando su homeostasis estrictamente controlada en estos últimos (Wandersman & Delepelaire, 2004). Asimismo, en los vertebrados, la reducción de la disponibilidad de hierro es uno de los mecanismos de defensa inmune no específicos contra patógenos microbianos (Ganz & Nemeth, 2015). Por consiguiente, la limitación excesiva de hierro, constituye uno de los signos que detecta un patógeno cuando inicia la colonización de un hospedador (Cassat & Skaar, 2013).

Por consiguiente, para sobrevivir dentro de un hospedador, la mayoría de las bacterias patógenas han desarrollado sofisticados mecanismos para obtener hierro de los tejidos del mismo, mecanismos que se reconocen como factores esenciales de virulencia. Las estrategias para la adquisición de hierro más extendidas entre las bacterias patógenas son la captación del grupo hemo y la producción de sideróforos (Saha *et al.* 2013; Ellermann & Arthur, 2017). Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro de bajo peso molecular, que pueden solubilizar el hierro o eliminarlo de otros quelantes, y transportarlo a la célula a través de las correspondientes proteínas receptoras de membrana. Algunas bacterias no solo producen sus propios sideróforos, sino que también expresan receptores capaces de transportar xenosideróforos producidos por otros organismos (Cornelis & Andrews, 2010).

Trabajos previos han demostrado que todas las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* eran capaces de utilizar hemoglobina y citrato de amonio férrico como fuentes únicas de hierro (Fouz *et al.*, 1994). Además, se ha evidenciado que todos los aislados de esta bacteria produjeron algún tipo de sideróforo cuando crecían en condiciones deficitarias de hierro (Fouz *et al.*, 1994; Fouz *et al.*, 1997). Sería en el año 2005, cuando a partir de un aislado humano de *P. damsela* subsp. *damsela*, se obtuvo la secuencia completa de 10 genes responsables de codificar un sistema de captación del grupo hemo: las proteínas HutZ, HutX y HutW, los tres componentes del sistema TonB: TonB, ExbB y ExbD, los componentes del transportador ABC: HutBCD y el receptor de membrana HutA. Se demostraría que la clonación de este sistema completo en *Escherichia*

coli confería a esta especie la habilidad de emplear hemoglobina y hemina como fuentes de hierro (Rio *et al.*, 2005). Por lo tanto, *P. damsela* subsp. *damsela* posee receptores que le permiten captar hierro a partir del grupo hemo. También se ha demostrado que las cepas no degradan proteolíticamente la hemoglobina, sino que captan el grupo hemo directamente por interacción célula-Hb (Fouz *et al.*, 1997). Además, dado que este patógeno presenta la capacidad de producir hemolisinas en condiciones de exceso de hierro, éstas le proporcionarían una fuente adicional de hemoglobina en medios con sangre. Este dato podría estar relacionado con la expresión de un receptor de grupo hemo tanto en condiciones de déficit de hierro como de exceso del mismo (Fouz *et al.*, 1994). Asimismo, se ha demostrado la presencia del gen del receptor del grupo hemo *hutA*, en aislados procedentes de peces y humanos, y que la identidad de las secuencias nucleotídicas entre los operones de captación del grupo hemo en las subsp. *damsela* y subsp. *piscicida* es del 97% (Rio *et al.*, 2005). Aunque no se han realizado estudios funcionales con los genes de captación del grupo hemo en *P. damsela* subsp. *damsela*, sí se ha manifestado que esos genes son esenciales para la utilización del grupo hemo en la subespecie *piscicida*, y que dos genes del transportador ABC de hemina se expresaban durante el proceso infeccioso en peces (Osorio *et al.*, 2010). Anteriormente, ensayos de virulencia realizados en animales a los que se les había inyectado previamente una fuente de hierro, ya habían demostrado un aumento en la susceptibilidad de peces y ratones a la infección por este patógeno, indicando que el hierro es importante para que este patógeno marino pueda establecer una infección en un organismo hospedador (Fouz *et al.*, 1994).

Con respecto a la síntesis de sideróforos por parte de *P. damsela* subsp. *damsela*, a raíz de los primeros estudios se sugirió la producción de un sideróforo de tipo hidroxamato (Fouz *et al.*, 1997). Esto era debido a la capacidad que expresaba esta subespecie de promover el crecimiento de cepas indicadoras deficientes en la síntesis de hidroxamatos (Fouz *et al.*, 1997). Por otra parte, los ensayos de inducción de proteínas de membrana en medios con déficit de hierro, mostraron la presencia de tres proteínas reprimidas por hierro que

podrían estar implicadas en el sistema de captación del sideróforo (Fouz *et al.*, 1997). Trabajos recientes han demostrado que algunas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* son capaces de sintetizar bajo condiciones limitantes de hierro vibrioferrina como sideróforo, cuyos genes de síntesis y transporte (síntesis: *pvsABCDE*; transporte: *psuA-pvuABCDE*) se localizan en una isla genómica adquirida por transferencia horizontal (Puentes *et al.*, 2017; Balado *et al.*, 2017a). Un hecho curioso, es que la mayoría de las cepas de este microorganismo liberan citrato endógeno al medio extracelular en respuesta a la limitación de hierro (Balado *et al.*, 2017a). Si bien es cierto que, actualmente la producción de otros compuestos a base de citrato o de otras moléculas con actividad siderófora no puede descartarse del todo, los últimos resultados sugieren que el citrato endógeno, además de formar parte de la molécula de algunos sideróforos, puede ser utilizado por sí mismo para la absorción de hierro por parte de *P. damsela* subsp. *damsela* (Balado *et al.*, 2017a).

1.5.2. Citotoxinas con actividad hemolítica: la damselisina Dly y las toxinas formadoras de poro PhlyP y PhlyC

Sería en el año 1984, cuando Kreger establecería una correlación entre la capacidad de diferentes aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* de producir *in vitro* grandes cantidades de una citolisina, y su capacidad para infectar ratones (Kreger, 1984). Se observó que esta citolisina presentaba actividad hemolítica frente a la sangre de 16 especies de animales poiquiloterms y homeoterms, resultando ser más activa frente a eritrocitos de rata y ratón (Kreger, 1984). Además, la cantidad producida de esta toxina era variable, siendo cinco de los diecinueve aislados a ensayar, los que mostraban valores sensiblemente más altos y dosis letales más bajas para ratones (Kreger, 1984).

Un año más tarde, a partir de una fracción purificada se determinó que esta citolisina poseía un peso molecular de 69 KDa (Kothary & Kreger, 1985), siendo esta fracción además, más activa frente a eritrocitos de ratón, resultado coincidente con lo observado por los estudios de Kreger (1984). A diferencia de lo que sucedía con

fracciones menos purificadas, solo era activa frente a eritrocitos de cuatro especies animales, lo que ponía de manifiesto la presencia de otras enzimas con actividad hemolítica (Kothary & Kreger, 1985). Esta teoría estaba apoyada además por los resultados obtenidos mediante isoelectroenfoque de capa fina, que revelaron la presencia de tres bandas, una mayoritaria y dos minoritarias, que posteriormente mostraron ser hemolíticamente activas (Kothary & Kreger, 1985).

Los primeros pasos para la caracterización de esta citolisina se llevarían a cabo en 1987 por el trabajo de Kreger y colaboradores. Los autores denominaron damselisina (Dly) a la citolisina de *P. damsela* subsp. *damsela*, una toxina hemolíticamente activa con actividad fosfolipasa D frente a esfingomielina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Kreger *et al.*, 1987; Daniel *et al.*, 1988). Al igual que otras esfingomielinasas, Dly actuaba de modo sinérgico con la delta-toxina de *Staphylococcus aureus* frente a eritrocitos de oveja, potenciando el efecto hemolítico de la delta-toxina de esta última al eliminar las cabezas polares de colina de la esfingomielina (Kreger *et al.*, 1987), lo que constituye la primera evidencia de que Dly puede actuar sinérgicamente con hemolisinas producidas por otras células. Posteriormente, Cutter y Kreger (1990) descartarían que el gen de la damselisina (*dly*) estuviese en un plásmido, y propusieron que formaba parte de un profago, ya que las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* más hemolíticas perdían dicho gen de manera espontánea, reduciéndose sensiblemente la hemólisis. Así que a pesar de que *dly* fue clonado y expresado en *E. coli*, su contexto genético era desconocido (Cutter & Kreger, 1990).

Estos mismos autores hallaron un hecho relevante para el conocimiento de la actividad hemolítica en este patógeno. Gracias a estudios de hibridación de ADN mediante Southern blot, se reveló la presencia del gen *dly* en las cepas que presentaban valores más altos de actividad hemolítica (Cutter & Kreger, 1990). Fouz *et al.* (1993) pondría de manifiesto también la variabilidad de la capacidad hemolítica de diversas cepas de este microorganismo. Asimismo, investigaciones realizadas por Osorio *et al.* (2000a) informarían de otros hechos significativos: i) la existencia de cepas hemolíticas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes del gen *dly* (lo que sugirió que la

actividad hemolítica de este patógeno no solo residía en la damselisina); y ii) la capacidad de esas cepas de desencadenar una patología en peces y ratones (Osorio *et al.*, 2000a). Posteriormente se demostraría además, que cepas negativas para *dly* eran tóxicas para líneas celulares homeotermas y poiquilotermas (Labella *et al.*, 2010a). A pesar de estos últimos descubrimientos, durante años, la damselisina fue considerada como uno de los principales factores de virulencia de *P. damsela* subsp. *damsela* debido a su capacidad hemolítica y fosfolipasa (Osorio *et al.*, 2000a).

Durante décadas el contexto genómico del gen *dly* permaneció en el más absoluto desconocimiento. No sería hasta el año 2011, cuando Rivas *et al.* identificarían un plásmido de 150 Kb, denominado pPHDD1 (Fig. I.11). Este elemento móvil estaba presente tanto en aislados de peces como de humanos. La caracterización de pPHDD1 revelaría la predicción de 171 ORFs (*Open Reading Frame*; marco de lectura abierto) y la distinción de cinco módulos de genes: un módulo de replicación (genes *rep*), un módulo de partición (genes *par*), un módulo de conjugación (genes *tra*), un módulo de adherencia (genes *tad*, *tight adherence*) y por último, un módulo de hemólisis constituido no solo por el gen *dly* sino también por el gen de una hemolisina formadora de poro que se denominó inicialmente *hlyA_{pl}* (Rivas *et al.*, 2011). Años más tarde, la toxina formadora de poro HlyA_{pl} sería renombrada como fobalisina P (PhlyP), acrónimo que significa “lisina de *Photobacterium* codificada en plásmido”. PhlyP es una toxina con actividad hemolítica que forma poros de membrana en las células diana, causando una salida de K⁺ y la entrada de colorantes vitales (Rivas *et al.*, 2015a). Curiosamente, los genes de las toxinas Dly y PhlyP (VDA000159 y VDA000160, respectivamente) son contiguos en la secuencia de pPHDD1 pero se transcriben a partir de cadenas divergentes (Fig. I.11).

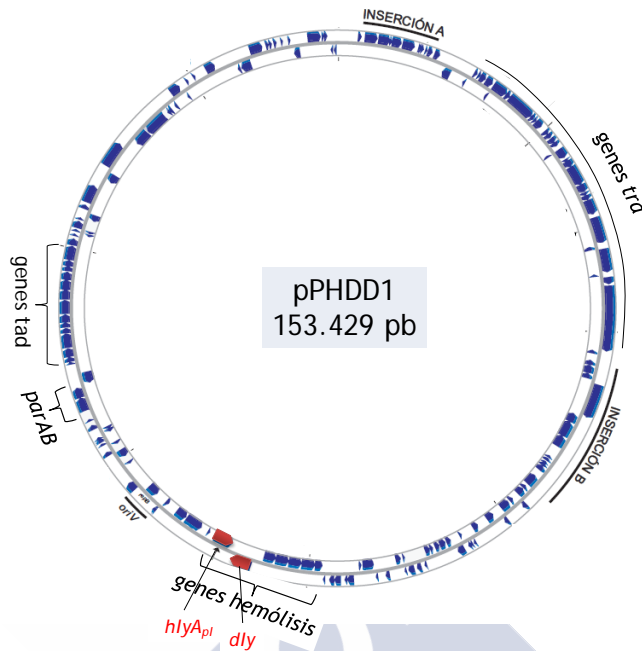


Fig. I.11: Representación circular de pPHDD1. Se resalta módulos funcionales, inserciones de ADN específicas de la cepa RM-71 y origen de replicación (*oriV*). Señalamos en rojo los genes *dly* y *hlyA_{pl}*.

Posteriormente, se demostró que todos los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela*, independientemente de que albergasen pPHDD1, presentaban en su cromosoma I un gen codificante para una nueva toxina formadora de poro con capacidad hemolítica, el gen *hlyA_{ch}* (Rivas *et al.*, 2013b; Rivas *et al.*, 2014), poniéndose de manifiesto que la hemólisis producida por cepas carentes del plásmido era debida a esta toxina. El gen *hlyA_{ch}* codifica para la fobalisina C (PhlyC), toxina que comparte el 92% de identidad en secuencia aminoacídica con PhlyP (Rivas *et al.*, 2014). Así que, en base a estos estudios, los aislados que albergan pPHDD1 producen tres hemolisinas diferentes (Dly, PhlyP y PhlyC), mientras que las cepas que no portan pPHDD1 solo sintetizan la hemolisina PhlyC.

Estudios en profundidad de las características fenotípicas de las tres hemolisinas Dly, PhlyP y PhlyC (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013b), permitirían entender los tres fenotipos hemolíticos (halo

grande, moderado y pequeño) observados en los diferentes aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* a lo largo de numerosos estudios (Kreger, 1984; Clarridge & Zighelboim-Daum, 1985; Cutter & Kreger, 1990; Fouz *et al.*, 1993; Labella *et al.*, 2010a; Osorio *et al.*, 2000a; Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013b). De este modo, se demostró que: i) el fenotipo de halo hemolítico grande sería el resultado de la secreción de las tres hemolisinas y por el efecto sinérgico entre Dly y PhlyP/PhlyC; ii) el halo pequeño resulta de la secreción de PhlyC; y iii) los halos intermedios observados en cepas que contienen el plásmido pPHDD1, son posiblemente el resultado de mutaciones puntuales que afectan a la actividad de alguna de las tres hemolisinas (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013b; Rivas *et al.*, 2014).

La sinergia entre Dly y PhlyP es mayor que la que existe entre Dly y PhlyC. Dly es incapaz por sí misma de producir hemólisis en sangre de oveja, pero es necesaria para producir efectos sinérgicos con cualquiera de las dos fobalisinas (PhlyP y PhlyC) en esta fuente de eritrocitos, lo que demuestra que al menos una de las dos toxinas formadoras de poro es necesaria y suficiente para producir hemólisis detectable en eritrocitos de oveja (Rivas *et al.*, 2013b). Por el contrario, Dly sí lisa los eritrocitos de ratón y rodaballo (Rivas *et al.*, 2013b). Por su parte, las dos toxinas formadoras de poro, PhlyP y PhlyC, poseen la capacidad de lisar los eritrocitos de oveja, ratón y rodaballo por sí solas (Rivas *et al.*, 2013b). En ensayos hemolíticos realizados con productos extracelulares bacterianos en eritrocitos de oveja, se demostraría que el fenotipo hemolítico producido por la acción conjunta de PhlyP y PhlyC constituía un fenómeno de adición pero no de sinergia, mientras que Dly actuaba de forma sinérgica con efecto CAMP con PhlyP y PhlyC, siendo el efecto sinérgico entre Dly y PhlyC el que contribuye a la virulencia de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* portadoras del pPHDD1, y siendo Dly el principal contribuyente a la hemólisis en eritrocitos de rata, rodaballos y humano (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013b). Con respecto al potencial patogénico, Rivas *et al.* (2013b) demostrarían que la virulencia para ratones de cepas portadoras de pPHDD1, reside principalmente en Dly y PhlyP. Por el contrario, en lo relativo a la

virulencia en peces, los mismos autores concluirían que las dos toxinas formadoras de poro PhlyP y PhlyC por si solas no causan la muerte en rodaballos, sino que es necesaria la presencia de Dly (efecto sinérgico) o de la otra hemolisina (efecto aditivo) para causar el deceso.

1.6. ¿EXISTEN OTROS FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *P. DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE* NO PORTADORAS DEL PLÁSMIDO VIRULENTO PHDD1?

La adaptabilidad a nuevas fuentes nutricionales es crucial para que una especie cambie de un macroambiente a un microambiente. La supervivencia en las condiciones limitadas de nutrientes de la columna de agua y los sedimentos marinos requiere que un organismo utilice eficientemente los nutrientes disponibles. Del mismo modo, la adaptación a los diversos entornos, como puede ser un hospedador, también requiere de la capacidad de cambiar de zonas pobres en nutrientes a ricas en nutrientes, y de vivir en libertad a vivir en condiciones asociadas con el hospedador. Igualmente, también se requiere que una especie pueda competir por los nutrientes con la microbiota residente (Boyd *et al.*, 2015). El crecimiento y la proliferación de bacterias patógenas en un hospedador, son el resultado de todo un proceso multifactorial que depende, en gran medida, de la acción de enzimas proteolíticas y lipolíticas secretadas por el microorganismo (Travis *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 2013). En general, estas enzimas extracelulares, incluidas las de la familia *Vibrionaceae*, han sido consideradas como importantes factores de virulencia, ya que pueden interferir directamente con las funciones de las células del hospedador, o estar involucradas en el procesamiento de otros factores de virulencia bacterianos (Lee *et al.*, 1998; Matsushita & Okabe, 2001; Frees *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Stehr *et al.*, 2003; Bender & Flieger, 2010; Hausmann & Jaeger, 2010). A pesar de que la histotoxicidad de las bacterias patógenas depende en gran medida de la producción de toxinas, se cree que las enzimas proteolíticas y lipolíticas desempeñan un papel clave en la colonización del hospedador, dado que ayudan a la propagación del

patógeno en los tejidos del mismo al degradar componentes extracelulares, contribuyen a la evasión del sistema inmune del hospedador, a la disponibilidad de aminoácidos para la supervivencia y el crecimiento bacteriano; y facilitan la difusión de las toxinas (Bond & Wart, 1984; Salyers & Witt, 1994; Harrington, 1996; Eckhard *et al.*, 2009; Matsushita & Okabe, 2001; Duarte *et al.*, 2014).

Todas estas características, sumadas a las observaciones de que los principales factores de virulencia descritos hasta la fecha en *P. damsela* subsp. *damsela* se circunscriben a enzimas codificadas en un elemento móvil (el plásmido pHDD1), y de que la mayoría de las cepas aisladas de brotes en piscifactorías no posean dicho plásmido (Labella *et al.*, 2010a; Rivas *et al.*, 2014; Terceti *et al.*, 2016) pero sigan siendo virulentas para peces y citotóxicas para diversas líneas celulares a pesar de ello (Fouz *et al.*, 1992; Labella *et al.*, 2010a; Rivas *et al.*, 2011), revelan la importancia de identificar factores de virulencia potenciales entre las enzimas secretadas por las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pHDD1.

La caracterización de diversos aislados de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* llevada a cabo a lo largo de los últimos años, ha revelado la presencia de actividades enzimáticas de gran interés patogénico. Así por ejemplo, se han detectado las actividades fosfolipasa, gelatinasa, lipasa e incluso acetilcolinesterasa. Más aún, un trabajo reciente demostró que los productos extracelulares de cepas virulentas para peces, poseían actividades enzimáticas tales como lipasa, amilasa, fosfolipasa, fosfatasa alcalina, esterasa-lipasa, fosfatasa ácida y β -glucosaminidasa (Labella *et al.*, 2010a). Asimismo, el tratamiento a 100 °C durante 10 min de estos productos extracelulares abolía las actividades de fosfolipasa y hemólisis, así como la capacidad de causar muerte en los peces y citotoxicidad en líneas celulares, lo que sugiere que la toxicidad no es debida al contenido de lipopolisacáridos termorresistentes (Fouz *et al.*, 1993; Labella *et al.*, 2010a). Partiendo de estos datos, consideramos de máximo interés iniciar el estudio de las actividades fosfolipasa, gelatinasa y lipasa, y su posible participación en la patogenicidad de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes del plásmido virulento pHDD1.

1.6.1. Las fosfolipasas bacterianas y su relación con la patogenicidad

Los fosfolípidos son componentes clave de todas las membranas celulares, al ser los responsables de separar los ambientes intracelular y extracelular, y de servir como andamiaje para las proteínas de membrana (Titball, 1998). Dada la naturaleza anfipática de los fosfolípidos, éstos suponen un obstáculo para la actuación de las enzimas bacterianas, ya que sus sustratos se ensamblan en bicapas o incluso en micelas fosfolípicas (Schmiel & Miller, 1999). Además, a lo largo de los años, se ha tomado conciencia del papel de los fosfolípidos de membrana y sus productos hidrolíticos (fosfatidilinositol, diacilglicerol...) en los sistemas de señalización celular (Samuelsson, 1983; Titball, 1998; Stancevic & Kolesnick, 2010). Teniendo en cuenta estos papeles y la distribución generalizada de los fosfolípidos, no es sorprendente que una amplia variedad de bacterias hayan desarrollado enzimas capaces de hidrolizarlos (Titball, 1998).

Las fosfolipasas bacterianas son un grupo heterogéneo y ubicuo de esterasas, que suelen estar asociadas a la superficie celular o son secretadas por una amplia variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Flores-Díaz *et al.*, 2016). Asimismo, también están presentes en animales, plantas y hongos. Estas enzimas lipolíticas son las responsables de hidrolizar los fosfolípidos, los cuales contienen dos ácidos grasos esterificados en las posiciones sn-1 y sn-2 de un esqueleto de glicerol, y un grupo de cabeza polar (los más comunes son colina, etanolamina, serina e inositol) unido a la posición sn-3, que define el fosfolípido (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina o fosfatidilinositol) (Fig. I.12).

En lo relativo a la clasificación de las fosfolipasas, ésta tiene en cuenta el sitio de ataque al fosfolípido, es decir, el enlace éster que escinden. Se utilizan letras de calificación A, B, C y D para diferenciar los tipos de fosfolipasa, e indicar el enlace específico dirigido a la molécula de fosfolípido (Mollby, 1978). Las fosfolipasas A (PLA), que se subdividen a su vez en A₁ y A₂, hidrolizan los enlaces carboxiésteres de la posición sn-1 o sn-2, respectivamente. Su escisión

libera un ácido graso junto con un lisofosfolípido (Fig. I.12). Las fosfolipasas B (PLB), en cambio, actúan sobre ambos residuos de ácidos grasos. Si solo se dirige a un ácido graso, se genera un lisofosfolípido que se puede escindir adicionalmente mediante una lisofosfolipasa A (PLA), liberando así el otro ácido graso del esqueleto de glicerol (Fig. I.12). Por otra parte, las fosfolipasas C (PLC) y las fosfolipasas D (PLD) hidrolizan el enlace fosfodiéster orientado a la glicerina o el alcohol, respectivamente (Fig. I.12). Las nomenclaturas de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) para las fosfolipasas A₁ y A₂ son EC 3.1.1.32 y EC 3.1.1.4, respectivamente; EC 3.1.4.3 para fosfolipasa C y EC 3.1.4.4 para fosfolipasa D. Estas siglas hacen referencia al hecho de que sean esterasas que actúan bien sobre el éster carboxílico (3.1.1.X), o sobre el enlace fosfórico (EC 3.1.4.X).

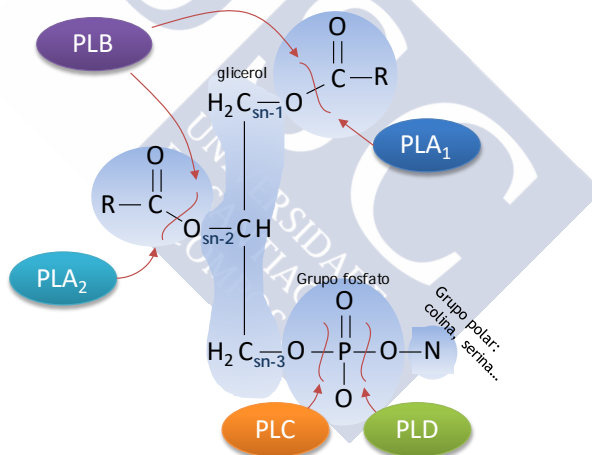


Fig. I.12: Representación de los sitios de acción de varias fosfolipasas sobre un fosfolípido generalizado, donde N= fosfolípido base común (ejemplos: colina, etanolamina, inositol). Los diversos sitios de ataque para la escisión hidrolítica de los tipos de fosfolipasas PLA₁, PLA₂, PLB, PLC y PLD se muestran con flechas.

Las fosfolipasas bacterianas secretadas, participan en la adquisición de fosfato de fuentes de carbono, y en algunos casos, actúan como factores de virulencia. Aunque la definición de una toxina bacteriana es cada vez más difícil, se acepta generalmente que muchas de estas fosfolipasas son toxinas. De hecho, la primera toxina

bacteriana demostrada en ser una fosfolipasa fue la α -toxina de *Clostridium perfringens* (Macfarlane *et al.*, 1941), hallazgo que estimuló el gran interés en este grupo de enzimas en las décadas posteriores.

En general, la toxicidad de las fosfolipasas se ha relacionado con su actividad citolítica (Fig. I.13), debido a su actuación sobre los fosfolípidos de la membrana y la consiguiente destrucción de la misma (Schmiel & Miller, 1999). Este hecho facilita la colonización y diseminación bacteriana proporcionando nutrientes para la supervivencia y replicación del patógeno (Schmiel *et al.*, 1998; van der Meer-Janssen *et al.*, 2010) (Fig. I.13).

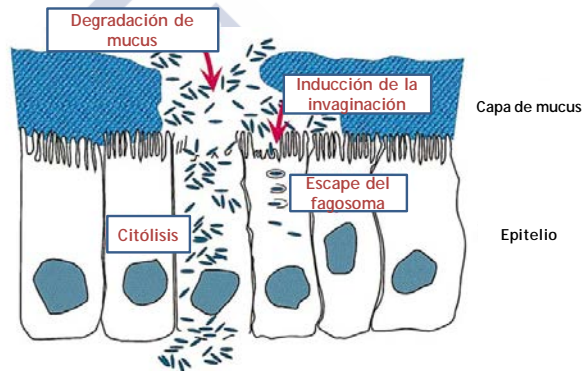


Fig. I.13: Las bacterias representadas como barras azules segregan una fosfolipasa que ayuda a la degradación y penetración de la capa de moco. Una vez que las bacterias alcanzan la superficie epitelial, la acción fosfolipasa desencadena la invaginación bacteriana por una célula epitelial. La actividad de la fosfolipasa promueve entonces el escape de la vacuola o fagosoma en la célula epitelial derecha y promueve la citólisis en la célula epitelial izquierda. La citólisis puede desencadenarse desde dentro o fuera de la célula eucariota. Imagen modificada de Schmiel & Miller (1999) (con permiso de Elsevier).

Es curioso, además, que algunas fosfolipasas generan lípidos bioactivos que activan mediadores endógenos de la muerte celular sin inducir la lisis celular (Istivan & Coloe, 2006; Sitkiewicz *et al.*, 2007; van der Meer-Janssen *et al.*, 2010) (Fig. I.14). Incluso, otras fosfolipasas bacterianas son esenciales para la virulencia de patógenos intracelulares, facultativos u obligatorios. Estas enzimas son capaces

de actuar sobre los fosfolípidos de las vacuolas celulares, bien contribuyendo a transformar los fagosomas en un nicho permisivo para la replicación del patógeno; o bien causando alteración en la membrana del fagosoma, de modo que permita la llegada de la bacteria al citoplasma de la célula hospedadora, y de esta manera pueda sobrevivir al evadir la respuesta inmune del hospedador (Camilli *et al.*, 1993; Songer, 1997; van der Meer-Janssen *et al.*, 2010). Un ejemplo es la fosfolipasa C en combinación con la toxina listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* (Camilli *et al.*, 1993; Alberti-Segui *et al.*, 2007; Poussin *et al.*, 2009).

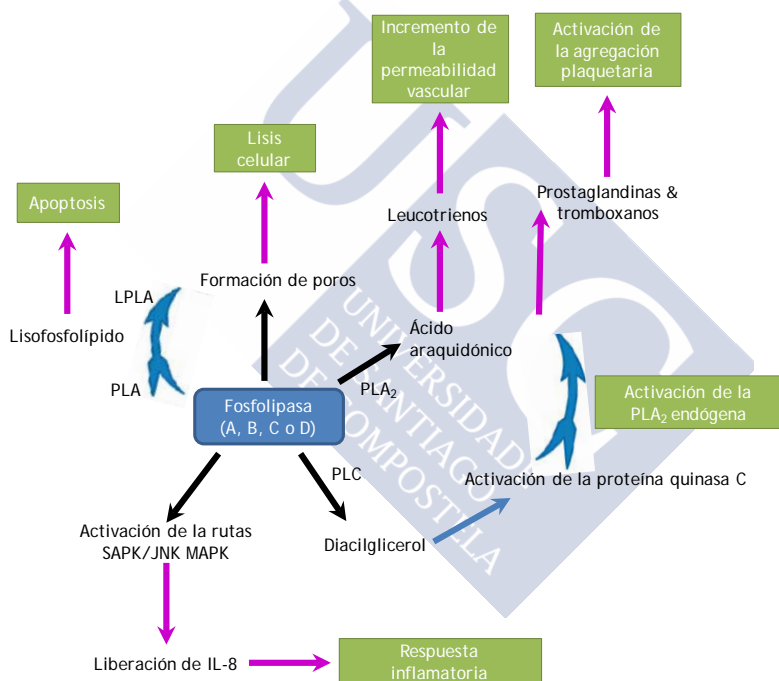


Fig. 1.14: Vías de señalización eucarióticas inducidas por la acción de fosfolipasas bacterianas y efectos correspondientes en la célula huésped. Las flechas no indican necesariamente una inducción directa. Figura modificada de Bender & Flieger (2010) (con permiso de Springer Nature).

Quizá el aspecto más intrigante de este tipo de enzimas, sea su potencial para interferir en la señalización celular y conseguir mediar la respuesta inmune del hospedador (Exton, 1990; Nishizuka, 1992;

Fiore *et al.*, 1997; Titball, 1998) (Fig. I.14). La acción de las fosfolipasas bacterianas sobre los fosfolípidos del hospedador, genera metabolitos secundarios idénticos a los producidos por las enzimas eucariotas. Estas enzimas juegan papeles cruciales en distintos procesos fisiológicos, incluyendo la dinámica de las membranas, señalización celular, migración, crecimiento y muerte celular (Vadas *et al.*, 1993; Granata *et al.*, 2003; Toker, 2005; Nikolova-Karakashian & Rozenova, 2010; Lang & Flieger, 2011; Castro *et al.*, 2014), de modo que la adición de los productos de la degradación de fosfolípidos por las enzimas bacterianas altera todos estos procesos en la célula hospedadora (Fig. I.14).

1.6.2. Las colagenasas bacterianas y su relación con la patogenicidad

El colágeno juega un papel central como componente extracelular primario en la ultraestructura de varios tejidos animales (piel, tendones, vasos sanguíneos, hueso), contribuyendo a la forma de los órganos y a la integridad de los tejidos de los vertebrados. Se estima que constituye el 30% de proteínas totales en mamíferos, el 3% en peces teleósteos y el 10% en elasmobranquios (Ricard-Blum, 2011; FAO, 2016). Por otro lado, el colágeno sirve como fuente importante de nutrientes y energía en el medio marino y su degradación por diversos microorganismos contribuye al nitrógeno global y al ciclo del carbono (Duarte *et al.*, 2014). Al hablar de colágeno deberíamos hacerlo en plural, ya que es una familia numerosa compuesta por 28 miembros diferentes que comparten una estructura concreta (Ramachandran, 1988; Pal & Surech, 2016).

Se denominan colagenasas a las enzimas capaces de hidrolizar específicamente colágeno nativo (tropocolágeno) bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura, así como el colágeno desnaturalizado soluble (Harrington, 1996). Actualmente se ha demostrado la producción de colagenasas en animales, plantas y microorganismos, diferenciándose entre sí por sus especificidades de sustrato y por los puntos de ataque al colágeno, entre otras características (Mookhtiar & Van Wart, 1992; Pal & Suresh, 2016). Hasta la fecha, se han purificado, secuenciado y clonado colagenasas

microbianas de pocas especies, generalmente de bacterias patógenas, estando todavía muchas de ellas sin caracterizar enzimática y estructuralmente (Teramura *et al.*, 2011).

Debido a la estructura rígida del colágeno en fibrillas polipeptídicas, solo un número limitado de enzimas proteolíticas tienen la capacidad de descomponerlo (Watanabe, 2004). Según la discriminación de los sitios activos, la base de datos MEROPS (Rawling *et al.*, 2016) clasificó a las enzimas colagenolíticas en: i) metaloproteasas (familias M9 y M10), cisteína proteasas (familia C1); ii) serina proteasas (familias S1, S8 y S53); y iii) algunas proteasas de la familia U32. Solo las metaloproteasas de la familia de peptidasas M9 son consideradas como colagenasas bacterianas verdaderas o metalocolagenasas (Duarte *et al.*, 2014), por lo que centraremos nuestra revisión bibliográfica en ellas.

Las metalocolagenasas bacterianas (EC 3.4.24.3) son enzimas capaces de hidrolizar el colágeno nativo, y al igual que el resto de las metaloproteasas, son dependientes de zinc y presentan el motivo conservado HEXXH como centro catalítico y zona de unión a zinc (Vallee & Auld, 1990; Duarte *et al.*, 2014). Basándose en las diferencias en las secuencias de aminoácidos y en la función catalítica, esta familia se divide en M9A y M9B, categorías que engloban colagenasas de *Vibrio* spp. y *Clostridium* spp., respectivamente (Rawlings *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2014).

En un principio, la subfamilia de las peptidasas M9A se subdividió en tres clases (I, II y III), atendiendo a sus masas moleculares, especificidad de sustrato, secuencias aminoacídicas y motivo de unión a zinc HEXXH-E (Vallee & Auld, 1990; Lee *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2014). Posteriormente, dada la baja similitud de las secuencias entre los miembros de la clase I y los de las clases II y III, la clase I sería asignada a la familia de las peptidasas M4 (familia de las termolisinas) (Lee *et al.* 1998; Rawling *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2014), por lo que quedan fuera del alcance de nuestro interés. Las clases II y III de las metaloproteasas de *Vibrio* spp. (M9A), contienen enzimas asociadas a los grupos MEROPS M09.001 y M09.004, respectivamente, que presentan como enzimas holotipo la colagenasa bacteriana V de *V.*

alginolyticus (X62635) y la peptidasa VMC de *V. mimicus* (AF004832) (Rawlings *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2014). En la Tabla I.5 podemos observar las características distintivas de las clases II y III de las metaloproteasas de *Vibrio* spp.

Tabla I.5: Esquema de la clasificación actual y características de las metalocolagenasas de *Vibrio* spp., y ejemplos de microorganismos productores. Información procedente de Matsushita & Okabe (2001), Rawlings *et al.* (2016), Duarte *et al.* (2014) y Pal & Suresh (2016).

Metalocolagenasas M9: Subfamilia M9A		
	Clase II (M09.004)	Clase III (M09.001)
Enzima holotipo:	Peptidasa VMC (de <i>V. mimicus</i>)	Colagenasa bacteriana V (de <i>V. alginolyticus</i>)
Masas moleculares:	62-71 kDa	89 kDa
Motivo de unión a zinc (HEXXH-E):	HEYTH-E	HEYVH-E
Especificidad de sustrato:		
Colágeno	✓	✓
Caseína	x	✓
Gelatina	✓	✓
Péptidos sintéticos	✓	✓
<i>Vibrio</i> spp. productores:	<i>V. mimicus</i> (VMC) <i>V. parahaemolyticus</i> (PrtV) <i>V. cholerae</i> (VchC)	<i>V. parahaemolyticus</i> (VppC) <i>V. alginolyticus</i> (VAC) <i>V. parahaemolyticus</i> (VPM)

(✓): actividad hidrolítica positiva

(x): actividad hidrolítica negativa

Por otro lado, el análisis de las arquitecturas de dominios proteicos mostró que la organización estructural de las metalocolagenasas de *Vibrio* difiere entre las clases II y III. Las enzimas de la clase III poseen un dominio activador, un dominio peptidasa o catalítico, uno o varios dominios similares al dominio enfermedad poliquística (PKD), y/o uno o varios dominios C-terminal prepeptidasa (PPC). Además, presentan un motivo de unión a zinc con secuencia HEVTH-E (Tabla I.5). Por el contrario, las metalocolagenasas de *Vibrio* de clase II no presentan los dominios de tipo PKD, pero sí los dominios de activación, catalítico o PCC, dando como resultado enzimas de menor masa molecular. La secuencia

consenso para el motivo de unión a zinc de las enzimas de clase II es HEYTH-E (Kim *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

En lo referente a las colagenasas clostridiales, es necesario comentar que su investigación se ha realizado con mucho más detalle, en comparación a las colagenasas de *Vibrio* spp. Por su parte, las peptidasas M9B de *Clostridium* spp. se agruparon en dos clases (I y II) en base a sus cinéticas, características estructurales (lo que incluye sus actividades frente a distintos sustratos), estabilidad frente a ciclos de congelación-descongelación y estructuras primaria, secundaria y terciaria (Van Wart & Steinbrink, 1981; Van Wart & Steinbrink, 1985; Duarte *et al.*, 2014). La clase I (M09.002) posee como holotipos las colagenasas ColG y ColA de *Clostridium histolyticum*, y la clase II (M09.003) la ColH de *C. histolyticum* (Rawlings *et al.*, 2016).

En los últimos años, se ha descubierto que un número creciente de bacterias producen enzimas hidrolíticas de colágeno, llegando a estar relacionadas con la capacidad virulenta de muchas de ellas (Lawson & Meyer, 1992; Takeuchi *et al.*, 1992; Matsushita *et al.*, 1999; Mukherjee *et al.*, 2009). Este tipo de enzimas ayudan en la colonización del hospedador en el proceso infectivo, contribuyendo a la disponibilidad de aminoácidos para la supervivencia y el crecimiento, y facilitando la difusión de toxinas (Duarte *et al.*, 2014). Las colagenasas en cuyo estudio más se ha profundizado son las de diversas especies de *Clostridium*: *Clostridium* spp. (Awada *et al.*, 2000; Popoff & Bouvet, 2009), *C. difficile* (Seddon *et al.*, 1990), *C. tetani* (Bruggemann *et al.*, 2003) y *C. histolyticum* (Eckhard *et al.*, 2014); seguidas por las de *Bacillus* spp. (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis* y *B. cytotoxicus*) (Beecher *et al.*, 2000; Abfalter *et al.*, 2016).

1.6.3. Las lipasas bacterianas y su relación con la patogenicidad

Los lípidos, el principal objetivo de las enzimas lipolíticas, son moléculas esenciales en los sistemas vivos, siendo la fuente de energía más importante y jugando un papel relevante en la estructura de las membranas y en diversos procesos de señalización celular. Las enzimas lipolíticas son un grupo de enzimas que se encuentran

ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en animales (Carriere *et al.* 1994), plantas (Bhardwaj *et al.* 2001), como en diversos microorganismos (Olempska-Beer *et al.* 2006), y que alberga a una gran cantidad de esterasas tales como: lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3), carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), fosfolipasas (ver sección 1.6.1), colinesterasas (EC 3.1.1.8), cutinasas (EC 3.1.1.74), entre muchas otras (Arpigny & Jaeger, 1999; Hausmann & Jaeger, 2010; Lenfant *et al.*, 2013; Borrelli & Trono, 2015). En este apartado, nos centraremos en el conocimiento de las lipasas verdaderas bacterianas.

Las lipasas (EC 3.1.1.3), son esterasas que hidrolizan acilglicerol de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono) insolubles en agua, dando lugar a ácidos grasos y glicerol (Arpigny & Jaeger, 1999). Además, se diferencian del resto de esterasas porque muestran preferencia por sustratos altamente hidrofóbicos, insolubles y agregados, y presentan sitios de unión grandes para acomodar al ácido graso a escindir (Bornscheuer, 2002). Las lipasas muestran también, un mayor número de aminoácidos no polares localizados en las zonas expuestas al solvente y en la región del centro activo, así como un rango de sustrato más amplio, y una mayor regiospecificidad y estereoespecificidad (Fojan *et al.*, 2000). Asimismo, estas enzimas se pueden distinguir del resto de las esterasas por el denominado “fenómeno de activación interfacial”. Este fenómeno de activación interfacial es debido a un dominio hidrofóbico, denominado “*lid*” (tapa), que se encuentra alrededor del centro activo de la enzima. Para que el centro activo sea accesible al sustrato insoluble, debe existir una concentración crítica del mismo para que se produzca el movimiento de esa tapa (Verger, 1997).

La función biológica de este tipo de enzimas bacterianas es incierta en muchos casos, aunque parece ser que está relacionada con la bioconversión de lípidos entre diferentes organismos y, dentro del mismo organismo, con diversos procesos de obtención o aprovechamiento de fuentes de carbono y reciclaje o modificación de las membranas celulares (Schmid & Verger, 1998; Bornscheuer, 2002). Estos procesos ayudan a las bacterias a crecer en ambientes limitantes de carbono, o en ambientes donde los lípidos son la única fuente de carbono (Fig. I.15) (Stehr *et al.*, 2003). Incluso se ha llegado

a relacionar la actividad de las lipasas con la detoxificación de agentes contaminantes y biocidas (Khalameyzer *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2003). Como dato curioso, desde hace bastantes años se vienen empleando estas enzimas lipolíticas para toda una serie de aplicaciones biotecnológicas en diversas industrias, tales como la farmacéutica, química, alimentaria, textil, papelera, etc. (Jaeger & Eggert, 1999; Jaeger *et al.*, 1999; Hasan *et al.*, 2006; Navarro-González & Periago, 2012; Ramnath *et al.*, 2017).

Por otro lado, y el más importante desde nuestro punto de vista, se ha considerado a las lipasas como factores de virulencia en determinadas patologías. Así por ejemplo, se ha demostrado la relevancia de estas enzimas para el crecimiento y colonización (Fig. I.15) durante los procesos infectivos de *Staphylococcus epidermidis* (Longshaw *et al.*, 2000), *Staphylococcus aureus* (Rollof *et al.*, 1988), *Pseudomonas aeruginosa* (Shabtai, 1991) o *Microthrix parvicella* (Nielsen *et al.*, 2002). Otra función asociada a las lipasas podría ser la de ayudar al microorganismo a adherirse al tejido del hospedador (Fig. I.15). La lipasa secretada por *Staphylococcus aureus* aumenta la adherencia mediante la degradación de moléculas de superficie del hospedador liberando así receptores (Stehr *et al.*, 2003). Otro ejemplo es el de las lipasas secretadas por el patógeno humano *Propionibacterium acnes*, las cuales mediante su acción liberan ácidos grasos al medio que ayudan a la adhesión bacteriana, y por lo tanto, a la colonización del hospedador (Miskin *et al.*, 1997; Bruggemann *et al.*, 2004). Además, los ácidos grasos libres generados por la hidrólisis de los triglicéridos también pueden perturbar el mantenimiento de la barrera de permeabilidad epidérmica (Hanley *et al.*, 2000), por lo que la liberación incontrolada de estos ácidos grasos podría facilitar la invasión del patógeno.

Otro posible rol de las lipasas, es que pueden realizar funciones más generales actuando como un factor de supervivencia, optimizando las condiciones para otras enzimas (Fig. I.15), como es el caso de *P. aeruginosa* (con efecto sinérgico entre la lipasa y la fosfolipasa C que secreta) (Jaeger *et al.*, 1992; Stehr *et al.*, 2003). También podría ser posible que las lipasas actuaran contra otros microorganismos de la

microbiota del hospedador, proporcionando al patógeno una ventaja de selección (Fig. I.15) (Stehr *et al.*, 2003).

De igual manera, nos encontramos con lipasas que exhiben actividad fosfolipasa adicional (Fig. I.15), como es el caso de la lipasa 2 secretada por *Staphylococcus warneri* (van Kampen *et al.*, 2001), capacidad enzimática ya relacionada con patogenicidad en el apartado 1.6.1.

En otro orden de ideas, hay que tener en cuenta que los lípidos, además de ser almacenes de energía y componentes estructurales de las membranas celulares, son también efectores biológicos muy importantes que actúan en la transducción de señales, transporte intracelular y transcripción de genes. La hidrólisis de triglicéridos por la acción de las lipasas genera diacilglicerol y ácidos grasos, productos que funcionan como segundos mensajeros que desencadenan diversas cascadas de transducción de señales (Fig. I.15) (Stehr *et al.*, 2003). Este tipo de procesos de transducción de señal pueden desembocar en una modulación de la transcripción de genes e incluso afectar a varias funciones del sistema inmune (Hausmann & Jaeger, 2010), como sucede con la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, que inhibe la fagocitosis por los macrófagos (Straus *et al.*, 1992); la lipasa de *S. aureus* que influye en la quimiotaxis de neutrófilos y granulocitos (Tyski *et al.*, 1987; Rollof *et al.*, 1988); o la lipasa de *P. aeruginosa*, que también influye sobre células del sistema inmune del hospedador (König *et al.*, 1996). Teniendo en cuenta todos estos efectos, es importante observar que la actuación combinada de la propia lipasa y los productos de su actividad enzimática contribuyen a la virulencia microbiana.

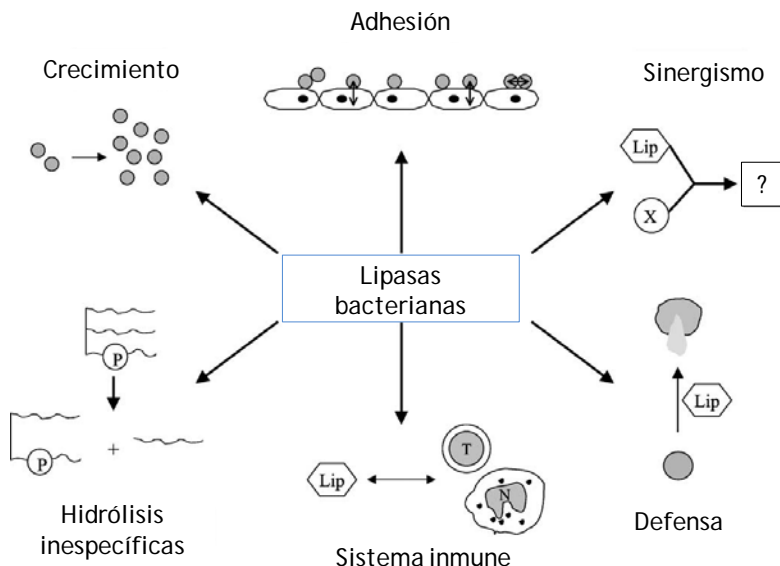


Fig. I.15: Posibles funciones de las lipasas extracelulares microbianas. Crecimiento: la lipólisis podría proporcionar fuentes de carbono que el microorganismo podría utilizar para el crecimiento; Adhesión: los ácidos grasos libres liberados debido a la actividad lipolítica podrían contribuir a la adhesión a tejidos, célula a célula y/o célula a hospedador; Sinergismo: una lipasa podría trabajar mano a mano con otra enzima o podría optimizar condiciones para otras enzimas; Hidrólisis inespecífica: las lipasas pueden poseer actividad fosfolipasa adicional; Sistema inmune: las lipasas y sus productos finales catalíticos pueden tener un efecto sobre diferentes células inmunes e iniciar procesos inflamatorios; Defensa: los microorganismos que secretan enzimas lipolíticas podrían tener una ventaja de selección por la lisis de la microbiota competitiva. Imagen modificada de Stehr *et al.* (2003) (con permiso de Elsevier).

A lo largo de este trabajo, intentaremos esclarecer la base genética de la patogenicidad expuesta por las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* no portadoras del plásmido de virulencia pHDD1, centrándonos principalmente en las capacidades enzimáticas (fosfolipasa, gelatinasa y lipasas) potencialmente relacionadas con la patogenicidad bacteriana, y exhibidas por este patógeno marino.

OBJETIVOS





2. OBJETIVOS

Tal y como se ha expuesto en la introducción general, en los últimos años *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido aislada como agente causal de enfermedad en nuevas especies de peces cultivados, e incluso en zonas geográficas donde no se había notificado previamente. Asimismo, la mayoría de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* aisladas recientemente de brotes en granjas acuícolas carecen del plásmido virulento pPHDD1 (no producen damselisina ni fobalisina P), por lo que es necesario iniciar estudios destinados a esclarecer las bases genéticas de la virulencia de este tipo de cepas.

Por ello, en este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Identificar mediante genómica comparada de genomas completos los genes de virulencia de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* no productoras de damselisina y fobalisina P, para comprender la base biológica de la estrategia de patogenicidad diferencial de las cepas que carecen del plásmido pPHDD1.

2. Caracterizar los genes que codifican actividades enzimáticas potencialmente involucradas en la patogenicidad, así como otros genes que se puedan identificar durante el desarrollo del objetivo 1, y analizar su papel en la virulencia para peces y en la citotoxicidad.



MATERIAL Y MÉTODOS





3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las características de las cepas y plásmidos empleados en este trabajo, al igual que sus derivados, se describen en las Tablas III.1, III.2 y III.3. De manera rutinaria, las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* se cultivaron a 25 °C en agar (TSA-1) o en caldo (TSC-1) de soja y triptona (Pronadisa) suplementado con 0,5% (p/v) adicional de NaCl de modo que la concentración final de cloruro sódico fuese del 1%. Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) (Pronadisa). Todas las cepas utilizadas así como sus derivados se mantuvieron a -80 °C en medio TSC-1 suplementado con un 20% (v/v) de glicerol.

En las ocasiones en las que era requerido el uso de antibióticos en los medios de crecimiento, ya fuese en medios sólidos o líquidos, las concentraciones finales de uso fueron las siguientes: ampicilina (Amp) 50 µg/mL (solución stock 50 mg/mL en agua); kanamicina (Kan) 50 µg/mL (sol. stock 50 mg/mL en agua); gentamicina (Gent) 10 µg/mL (sol. stock 10 mg/mL en agua); y rifampicina (Rf) 50 µg/mL (sol. stock 50 mg/mL en DMSO). Las soluciones de antibióticos se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros de 0,22 µm (Millipore) y se guardaron a 4 °C.

El control del crecimiento de los microorganismos en medio líquido se realizó mediante la determinación de la densidad óptica a una longitud de onda de 600nm en el espectrofotómetro GeneQuant100, según los tiempos de incubación requeridos para cada experimento.

Tabla III.1: Aislados de *P. damselae* subsp. *damselae* analizados en este trabajo.

CEPA	ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
ATCC 33539/CIP102761	EEUU/1981	Pez ángel (<i>Chromis punctipinnis</i>)	Cepa de referencia
H22060601R	España/2006	Pargo (<i>Pagrus auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
H01100403D1	España/2004	Pargo (<i>P. auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
H29060602R	España/2006	Pargo (<i>P. auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
C11080601R	España/2006	Corvira (<i>Argyrosomus regius</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
D20040408U	España/2004	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
H09060401H	España/2004	Pargo (<i>P. auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
H29040401H	España/2004	Pargo (<i>P. auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
H14060501H	España/2005	Pargo (<i>P. auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
H01100402O	España/2004	Pargo (<i>P. auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
Lb07070501R	España/2005	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
S04070503C	España/2005	Sargo común (<i>Diplodus sargus</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
LCA240907	España/2007	Barramundi (<i>Lates calcarife</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
H14060501B	España/2005	Pargo (<i>P. auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
H14060501R	España/2005	Pargo (<i>P. auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
H161203H	España/2003	Dorada (<i>S. aurata</i>)	Labella <i>et al.</i> (2010a)
9FT1M-3	EEUU	Tiburón (<i>Carcharhinus</i> sp.)	Donada por Grimmes, J.
9FT2B-2	EEUU	Tiburón (<i>Carcharhinus</i> sp.)	Donada por Grimmes, J.
RS80L1V1	EEUU	Pargo rojo (<i>Lutjanus campechanus</i>)	Donada por Grimmes, J.
RS78SPL1	EEUU	Pargo rojo (<i>L. campechanus</i>)	Donada por Grimmes, J.
162	Bélgica	Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	Colección de laboratorio
158	Bélgica	Anguila (<i>A. anguilla</i>)	Colección de laboratorio
LD-07	España	Dorada (<i>S. aurata</i>)	Vera <i>et al.</i> (1991)
RM-71	España	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Fouz <i>et al.</i> (1992)
RG-153	España	Rodaballo (<i>S. maximus</i>)	Fouz <i>et al.</i> (1992)
RG-91	España	Rodaballo (<i>S. maximus</i>)	Fouz <i>et al.</i> (1992)
RG-214	España	Rodaballo (<i>S. maximus</i>)	Fouz <i>et al.</i> (1992)
AZ 245.1	España	Rodaballo (<i>S. maximus</i>)	Colección de laboratorio
CDC-2227-81	EEUU	Humano	CDC, Atlanta, USA
ATCC 35083	EEUU	Tiburón (<i>Carcharhinus plumbeus</i>)	Donada por Grimmes, J.
309	España	Mejillón (<i>Mytilus edulis</i>)	Colección de laboratorio
PG-801	Taiwan	Langostino (<i>Penaeus monodon</i>)	Song <i>et al.</i> (1993)
J3G-801	Taiwan	Langostino (<i>P. monodon</i>)	Song <i>et al.</i> (1993)
192	EEUU	Delfín (<i>Tursiops truncatus</i>)	Donada por Grimmes, J.
238	EEUU	Delfín (<i>T. truncatus</i>)	Donada por Grimmes, J.
TW 294 L2	España	Lubina (<i>D. labrax</i>)	Colección de laboratorio
TW 250/03	España	Lubina (<i>D. labrax</i>)	Colección de laboratorio
TW 462/02.1	España	Lubina (<i>D. labrax</i>)	Colección de laboratorio
ST-1	EEUU	Trucha	Donada por Grimmes, J.
AZ 247.1	España	Rodaballo (<i>S. maximus</i>)	Colección de laboratorio
ACR 208.1	España	Rodaballo (<i>S. maximus</i>)	Colección de laboratorio
USC-Viro-1	España	Rodaballo (<i>S. maximus</i>)	Colección de laboratorio
ACRp 72.1	España	Rodaballo (<i>S. maximus</i>)	Colección de laboratorio
DCL 1.2	España	Dorada (<i>S. aurata</i>)	Colección de laboratorio
DCL 4.1	España	Dorada (<i>S. aurata</i>)	Colección de laboratorio
DCL 7.1	España	Dorada (<i>S. aurata</i>)	Colección de laboratorio
DCL 7.3	España	Dorada (<i>S. aurata</i>)	Colección de laboratorio
DCL 8.1	España	Dorada (<i>S. aurata</i>)	Colección de laboratorio
DCL 9.1	España	Dorada (<i>S. aurata</i>)	Colección de laboratorio

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla III.2: Cepas utilizadas en el presente trabajo.

CEPA	CARACTERÍSTICA(S) RELEVANTE(S)	REFERENCIA
<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>		
AVL49	LD-07 mutante espontáneo de rifampicina (LD-07 Rf ^R)	Este trabajo
AR57	RM-71 mutante espontáneo de rifampicina (RM-71 Rf ^R)	Rivas <i>et al.</i> (2011)
AR78	AR57 mutante por delección de <i>dly</i> y <i>hlyA_{pl}</i>	Rivas <i>et al.</i> (2011)
AVL63	AVL49 mutante por delección de <i>hlyA_{cr}</i>	Este trabajo
AR89	AR57 mutante por delección de <i>dly</i> , <i>hlyA_{pl}</i> y <i>hlyA_{cr}</i>	Rivas <i>et al.</i> (2013a)
AVL459	AVL63 complementado con pAVL449, Gent ^R	Este trabajo
AVL509	AVL63 complementado con pAVL500, Gent ^R	Este trabajo
AVL515	AVL63 complementado con pAVL498, Gent ^R	Este trabajo
AVL477	AR78 complementado con pAVL449, Gent ^R	Este trabajo
AVL453	AR78 complementado con pAVL500, Gent ^R	Este trabajo
AVL518	AR78 complementado con pAVL498, Gent ^R	Este trabajo
AVL58	AVL49 mutante por intercambio alélico de <i>plpV</i>	Este trabajo
AR64	AR57 mutante por intercambio alélico de <i>dly</i>	Rivas <i>et al.</i> (2011)
AVL471	AVL58 complementado con pAVL469, Gent ^R	Este trabajo
AVL64	AR57 mutante por intercambio alélico de <i>plpV</i>	Este trabajo
AVL66	AR57 mutante por intercambio alélico de <i>dly</i> y <i>plpV</i>	Este trabajo
AVL473	AVL64 complementado con pAVL469, Gent ^R	Este trabajo
AVL62	AVL49 mutante por intercambio alélico de <i>hlyA_{cr}</i> y <i>plpV</i>	Este trabajo
AVL60	AVL49 mutante por intercambio alélico de <i>colP</i>	Este trabajo
AVL491	AVL60 complementado con pAVL484, Gent ^R	Este trabajo
AVL68	AVL49 mutante para <i>hlyA_{cr}</i> , <i>plpV</i> y <i>colP</i>	Este trabajo
ΔAVL49::Tn 10(1)	AVL49 con mini-Tn 10 <i>fadL</i> 1::Tn 10, Kan ^R	Este trabajo
ΔAVL49::Tn 10(2)	AVL49 con mini-Tn 10 <i>lip80</i> ::Tn 10, Kan ^R	Este trabajo
ΔAVL49::Tn 10(3)	AVL49 con mini-Tn 10 <i>tetR</i> ::Tn 10, Kan ^R	Este trabajo
AVL70	AVL49 mutante por intercambio alélico de <i>colP</i>	Este trabajo
AVL479	AVL70 complementado con pAVL473, Gent ^R	Este trabajo
ΔAVL49::Tn 10(4)	AVL49 con mini-Tn 10 ??::Tn 10, Kan ^R	Este trabajo
ΔAVL70::Tn 10(1)	AVL70 con mini-Tn 10 <i>luxO</i> ::Tn 10, Kan ^R	Este trabajo
AR203	AVL49 con mini-Tn 10 <i>epsL</i> ::Tn 10, Kan ^R	Este trabajo
AR211	AVL49 mutante por delección de <i>epsL</i>	Este trabajo
AR240	AVL49 mutante por delección de <i>pilD</i>	Este trabajo
AVL535	AR211 complementado con pAVL529, Gent ^R	Este trabajo
AVL537	AR240 complementado con pAVL531, Gent ^R	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE4 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsd R17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Colección del laboratorio
S17-1-λpir	<i>recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir, Tp^R Sm^R</i>	Herrero <i>et al.</i> (1990)
<i>Vibrio anguillarum</i>		
R82	Control positivo para la actividad gelatinasa	Colección del laboratorio
<i>Aeromonas hydrophila</i>		
CMA 153	Control positivo para la actividad caseinasa y lipolítica (tween 80 y tween 20)	Colección de laboratorio

Rf^R: resistencia a rifampicina; Gent^R: resistencia a gentamicina; Kan^R: resistencia a kanamicina; Sm^R: resistencia a estreptomina; Tp^R: resistencia a trimetoprima.

Tabla III.3: Plásmidos empleados en este trabajo.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICA(S) RELEVANTE(S)	REFERENCIA
pWKS30	Vector de clonación de bajo n° de copia, Amp ^R	Wang & Kushner (1991)
pNidKan	Plásmido suicida derivado de pCVD442, pir, Kan ^R	Mouriño <i>et al.</i> (2004)
pBBR1-MCS5	Vector de clonación de bajo n° de copia Gent ^R	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pUC118	Vector de clonación de alto n° de copia, Amp ^R	Vieira & Messing (1987)
pLOF-Km	Mini-Tn10 transposón, Kan ^R	Herrero <i>et al.</i> (1990)
pAVL182	Construcción para mutar el gen <i>hlyA_{cr}</i> de la cepa LD-07 clonado en pNidkan, Kan ^R	Este trabajo
pAVL412	Construcción para mutar el gen <i>plpV</i> de LD-07 clonado en pNidkan, Kan ^R	Este trabajo
pAVL201	Construcción para mutar el gen <i>colP</i> de LD-07 clonado en pNidkan, Kan ^R	Este trabajo
pAVL307	Construcción para mutar el gen <i>lip80</i> de LD-07 clonado en pNidkan, Kan ^R	Este trabajo
pAJR203	Construcción para mutar el gen <i>epsL</i> de LD-07 clonado en pNidkan, Kan ^R	Este trabajo
pAJR211	Construcción para mutar el gen <i>pilD</i> de LD-07 clonado en pNidkan, Kan ^R	Este trabajo
pAVL449	pBBR1-MCS5 con <i>hlyA_{cr}</i> y su promotor de LD-07, almacenado en S17-1- λ pir	Este trabajo
pAVL500	pBBR1-MCS5 con <i>hlyA_{cr}</i> y su promotor de RM-71, almacenado en S17-1- λ pir	Este trabajo
pAVL498	pBBR1-MCS5 con <i>hlyA_{cr}</i> quimérica, almacenado en S17-1- λ pir	Este trabajo
pAVL469	pBBR1-MCS5 con <i>plpV</i> y su promotor de LD-07, almacenado en S17-1- λ pir	Este trabajo
pAVL484	pBBR1-MCS5 con <i>colP</i> y su promotor de LD-07, almacenado en S17-1- λ pir	Este trabajo
pAVL473	pBBR1-MCS5 con <i>fadL-lip80</i> y su promotor de LD-07, almacenado en S17-1- λ pir	Este trabajo
pAVL529	pBBR1-MCS5 con <i>epsL</i> y el promotor de <i>hlyA_{cr}</i> de LD-07, almacenado en S17-1- λ pir	Este trabajo
pAVL531	pBBR1-MCS5 con <i>pilD</i> y su promotor de LD-07, almacenado en S17-1- λ pir	Este trabajo

Amp^R: resistencia a ampicilina; Gent^R: resistencia a gentamicina; Kan^R: resistencia a kanamicina

3.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO Y PLASMÍDICO

Los protocolos básicos de manipulación de ADN se llevaron a cabo tal y como se describen en Sambrook & Russell (2001). El ADN genómico bacteriano se extrajo utilizando el producto comercial *Easy-DNA* (Invitrogen) para el empleo en PCR y el kit *GNOME DNA kit* (Qbiogene) para la secuenciación de los genomas de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* A-162, LD-07 y RM-71. Por su parte, la purificación rutinaria de plásmidos se realizó empleando el kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific).

3.3. REACCIONES EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR Y PCR-SOE)

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador de gradiente de temperaturas *Mycycler Thermal Cycler* (Bio-Rad) en volúmenes finales de 25 y 50 μL según el caso, utilizando 0,5 U de Taq polimerasa KAPA Taq (KAPA BIOSYSTEMS), tampón de PCR 10X, MgCl_2 2 mM, 200 μM de cada desoxinucleótido 5'-trifosfato (dNTPs) (Bioline), y 10 μM de cada cebador. Dependiendo de la T_m de cada pareja de cebadores, las temperaturas de hibridación oscilaron entre los 55 y 60 $^{\circ}\text{C}$. Los tiempos de elongación se seleccionaron en función del tamaño esperado del fragmento a amplificar ($1 \text{ min} \times \text{kb}^{-1}$). En todas las reacciones de PCR se incluyó un control negativo para garantizar la ausencia de ADN contaminante, y cuando fue posible, se incluyeron también controles positivos para asegurar que las condiciones empleadas eran las correctas y descartar falsos negativos.

Los productos de PCR obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 0,5 - 2%, según el tamaño de los fragmentos, con tampón TAE 1X (Tris 40 mM, EDTA 0,5 mM a pH 8,0) y una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de *Realsafe Nucleic Acid Staining Solution* (Intron biotechnology). Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Gelprinter Plus), a una longitud de onda de 254 nm y se fotografiaron con una cámara Scion Corporation. Como marcadores de peso molecular se emplearon los de 100 pb y 1 Kb de *O'GeneRuler* (Thermo Fisher Scientific), según las necesidades. La limpieza de los

productos de amplificación se realizó mediante el uso del kit comercial *NZYGelpure* (NZYtech), o bien, en el caso de obtener múltiples fragmentos de amplificación, los fragmentos de interés se purificaron con el *GeneJET™ Gel Extraction* kit (Thermo Fisher Scientific) tras su separación electroforética en geles de agarosa.

Tabla III.4: Cebadores empleados para el chequeo de los genes *hlyA_{cr}*, *plpV*, *colP* y *lip80*, y sus entornos; *dly* de pPHDD1 y tres genes del SSTIII de pPHDD203.

Cebador	Secuencia 5' - 3' ^a	pb amplificadas
Plásmido pPHDD1 (<i>dly</i>):		
Dly-5	CCTATGGGACATGAATGG	549
Dly-3	GCTCTAGGCTAAATGAATC	
Plásmido pPHDD203:		
<u><i>vscD</i> (VDA_000187)</u>		
vda-000187-intF	GCCGATCTCTTTCACCATTAT	140
vda-000187-intR	TAGAACCGCAAAACTGCAAC	
<u><i>vcrV</i> (VDA_000193)</u>		
vda-000193-intF	CCAACAATCGCGGCAAGAAT	240
vda-000193-intR	GAGGCTCTTGAATTGTTCTC	
<u><i>VDA_000224</i></u>		
vda-000224-intF	AGTTATAACCGACTTTACTG	511
vda-000224-intR	ACATGCTGGGCGATCAAGC	
Gen de la hemolisina <i>hlyA_{cr}</i>:		
hlyAcr_interno_F	CCAGATCGTATTGTATATGT	1.373
hlyAcr_interno_R	CACATTCAGCCGTCATTACT	
Gen de la fosfolipasa <i>plpV</i>:		
plpV_int_F	TCTCATAATAGCAGTAATCT	1.618
plpV_int_R	TTACTAAGCAGAATCCAGCC	
Gen de la collagenasa <i>colP</i>:		
chequeo_colP_F	CCTGCTACAGTTCGAGCTCA	1.056
chequeo_colP_R	TACGACATGCTCATATGCAG	
entorno_colP_F	GAGGACCATTATTGCCAGT	4.456 en <i>colP</i> (+)
entorno_colP_R	CGGCTAAGCAAACAGAAAAC	1.805 en <i>colP</i> (-)
Gen de la esterasa <i>lip80</i>:		
lipasa_interno_F	ATGCAGAGTGATTGATTGGG	1.735
lipasa_interno_R	CCGACGGTTGGAGTACCAGT	
mut_lipasa_1_XhoI	GCCTCGAGTTAGTCTCTTCGTGGCGCT	5.728 en <i>lip80</i> (+)
mut_lipasa_4_SmaI	GCCCCGGGAGGCGATATGTACCGGAATA	1.856 en <i>lip80</i> (-)

^aLa secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La técnica del empalme de genes por extensión de solapamiento o SOE-PCR (*Splicing by Overlap Extension*), permite la recombinación de moléculas de ADN en uniones precisas con independencia de la secuencia de nucleótidos en el sitio de la recombinación y sin el uso de endonucleasas de restricción o ligasas (Horton *et al.*, 1989). Esta técnica será empleada para la obtención del gen quimérico de la hemolisina PhlyC que contiene una fracción mayoritaria del gen *hlyA_{cr}* de la cepa LD-07 y una fracción minoritaria del gen *hlyA_{cr}* de la cepa RM-71.

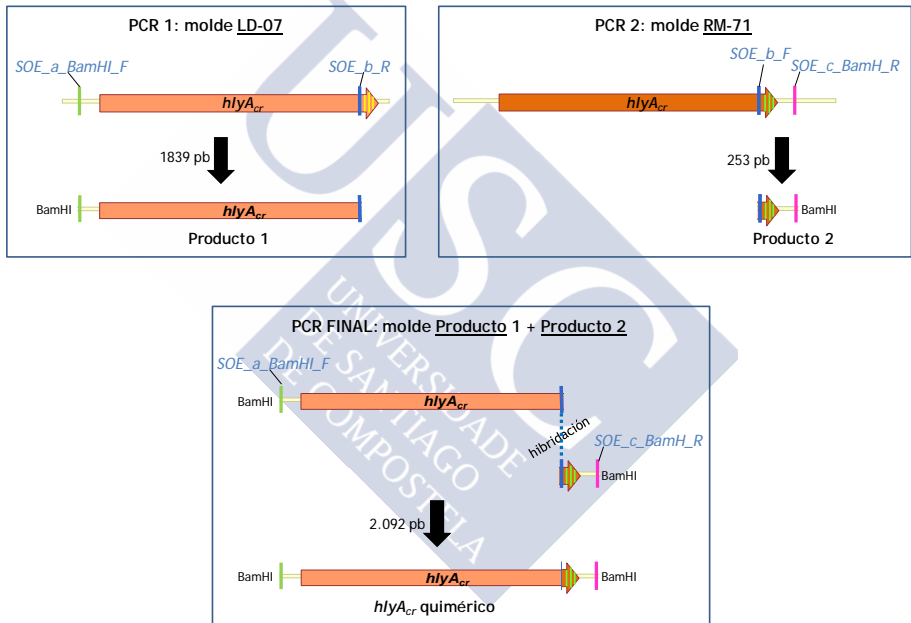


Fig. III.1: Representación esquemática de la PCR-SOE. En la PCR1, a partir del genoma de la cepa LD-07 se amplificará una porción del gen *hlyA_{cr}* en la que se excluyen las diferencias (rayas amarillas) observadas en el dominio lectina con respecto a *hlyA_{cr}* de la cepa RM-71. En la PCR2 se amplificará el final del gen *hlyA_{cr}* de la cepa RM-71. Durante la denominada PCR final, y empleando como moldes los productos 1 y 2, obtendremos el gen *hlyA_{cr}* quimérico de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* LD-07 y RM-71.

El proceso de SOE-PCR esquematizado se muestra en la Fig. III.1. Los fragmentos de los genes que se van a recombinar se generan en reacciones en cadena de la polimerasa separadas (PCR1 y PCR2) empleando los cebadores indicados en la Tabla III.5. Los cebadores SOE_b_F y SOE_b_R están diseñados para que los extremos de los productos contengan secuencias complementarias. Cuando los productos de estas PCR (Producto 1 y Producto 2) se mezclan, desnaturalizan y reasocian, las cadenas que tienen las secuencias coincidentes en sus extremos 3', se solapan y actúan como cebadores entre sí. La extensión de esta superposición por la ADN polimerasa en la PCR final (cebadores en Tabla III.5), origina una molécula *hlyA_{cr}* en la que las secuencias originales se empalman juntas. Una vez obtenido el producto de PCR *hlyA_{cr}* quimérico, se cortará con la enzima de restricción *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific), y tras su limpieza, se ligará al vector de clonación pBBR1MCS-5, previamente tratado con *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific) y fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). El plásmido pAVL498 obtenido, se conjugará con las cepas mutantes AVL63 y AR78, obteniendo las cepas recombinantes AVL515 y AVL518, respectivamente (Tabla III.2).

Tabla III.5: Cebadores empleados para la obtención de la hemolisina PhlyC quimérica.

Cebador	Secuencia 5' - 3' ^a	pb amplificadas
PCR 1 (Molde LD-07):		
SOE_a_BamHI	GCGGATCCATTCTTTGGAGTAAACATTT	1.839
SOE_b_R	GTTAAGTATTTATCTTCAAA	
PCR 2 (Molde RM-71):		
SOE_b_F	TTTGAAGATAAATACTTAAC	253
SOE_c_BamHI	GCGGATCCCAACAATATAGACATGAATC	
PCR FINAL:		
SOE_a_BamHI	GCGGATCCATTCTTTGGAGTAAACATTT	2.092
SOE_c_BamHI	GCGGATCCCAACAATATAGACATGAATC	

^aLa secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador

3.4. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Para las reacciones de clonación se utilizaron fragmentos derivados de la digestión con enzimas de restricción y plásmidos previamente cortados y tratados con fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Los fragmentos digeridos se limpiaron con el kit *GeneJETTM Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific).

La relación molar inserto/vector utilizada en la reacción de ligación fue 3:1, para un volumen final de 20 μ L con 1 U de ADN ligasa T4 y 2 μ L de tampón de reacción 10X (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones de ligación se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y se dializaron con filtros de membrana de 0,025 μ m (Millipore) durante 10 min previamente a su transformación en las cepas correspondientes de *E. coli*. Los clones recombinantes se seleccionaron en base al marcador de resistencia codificado por el vector (Fig. III.2) y se confirmaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

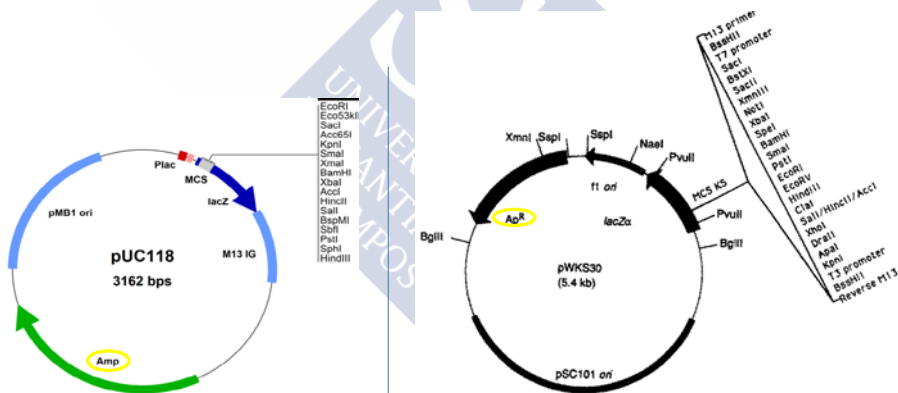


Fig. III.2: Mapa de los vectores de clonación pUC118 y pWKS30 utilizados en este trabajo. Todos ellos se caracterizan por llevar genes que confieren resistencia a antibióticos, de modo que los clones recombinantes puedan ser fácilmente aislados a partir de su siembra en medios selectivos. Representación del plásmido pWKS30 procedente de Wang & Kushner (1991) (con permiso de Elsevier).

3.5. ELECTROPORACIÓN DE PLÁSMIDOS EN *ESCHERICHIA COLI*

Para la obtención de células electrocompetentes de *E. coli* se partió de un cultivo de 500 mL de un cultivo bacteriano fresco de la cepa correspondiente (DH5 α y S17-1- λ pir). Se incubó a 37 °C en agitación (150 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,2 y 0,4. Tras centrifugar 20 min a 4.000 rpm (4 °C), se hicieron dos lavados con 10 mL de agua ultrapura (Mili-Q, Millipore) fría y estéril. Posteriormente, las células se resuspendieron en glicerol al 10% en agua, y se centrifugaron a 4000 rpm a 4 °C. Finalmente las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol 10% y se repartieron en tubos Eppendorf de 1,5 mL para almacenarlos a - 80 °C.

Para la transformación por electroporación se añadieron los 20 μ L de la reacción de ligación previamente dializada a los 50 μ L de las células electrocompetentes en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad). La transformación se llevó a cabo en un electroporador *Gene Pulser* (Bio-Rad) ajustado con los siguientes parámetros: voltaje de 2,5 kV, resistencia a 200 Ω , 25 μ F de capacitancia, con pulsos de 5 ms de duración. Posteriormente, se añadieron 1 mL de medio LB a la cubeta de electroporación para recoger las células electroporadas y se pasaron a un tubo Eppendorf de 1,5 mL que se incubó en agitación continua a 150 rpm durante 1h a 37 °C. Finalmente las células se centrifugaron, se resuspendieron en 0,1 mL de medio líquido LB y se sembraron en las placas de LB suplementadas con los antibióticos apropiados, según la resistencia conferida por el plásmido, y con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM y X-gal 40 μ g/mL en los casos en los que era necesario. Las colonias de coloración blanca, potencialmente transformantes, se reaislaron para su confirmación mediante PCR.

3.6. SECUENCIACIÓN DE ADN Y HERRAMIENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Para la secuenciación del genoma de las cepas A-162, LD-07 y RM-71 se utilizaron estrategias de secuenciación masiva. Además, en la realización de esta tesis se secuenciaron productos de PCR y fragmentos clonados en plásmidos mediante el método clásico de Sanger. Los detalles de cada estrategia se detallan a continuación.

3.6.1. Secuenciación del genoma de las cepas A-162, LD-07 y RM-71

La secuenciación de los genomas completos de las cepas A-162, LD-07 y RM-71 de *P. damsela* subsp. *damsela* se llevó a cabo utilizando un secuenciador Illumina MiSeq con cobertura de 100x. Las lecturas se ensamblaron mediante el programa SPAdes 3.6 (Nurk *et al.*, 2013). La anotación de las secuencias se realizó mediante el servicio bioinformático RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (<http://rast.nmpdr.org/>) (Overbeek *et al.*, 2014). La comparación de los genomas se realizó mediante el servidor RAST y el software Mauve 2.3.0. (Darling *et al.*, 2004). Para este análisis comparativo y la identificación de genes comunes específicos de cada cepa, los supuestos genes ortólogos se definieron como proteínas con 90% de identidad como mínimo.

3.6.2. Secuenciación clásica o Sanger

Para la secuenciación de plásmidos o productos de PCR se utilizó el kit comercial *GenomeLab DTCS quick start kit* (Beckman Coulter) y el secuenciador CEQ 8000 DNA. Tanto las reacciones de secuenciación como la limpieza de las mismas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando se utilizaron como molde productos de PCR, éstos se purificaron con el kit comercial *GeneJETTM Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific), y con el *GeneJETTM Gel Extraction kit* (Thermo Fisher Scientific) cuando se trataba de bandas recortadas de geles de agarosa. Para el análisis de las secuencias obtenidas se emplearon los programas BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) y Vector NTI versión 10.3.0 (Invitrogen). Mediante el algoritmo BLAST de la base de datos NCBI

se analizaron las homologías de las secuencias de nucleótidos (programa BLASTn) o aminoácidos (BLASTp) según el caso.

3.7. OTRAS HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y BASES DE DATOS EMPLEADAS

A lo largo del presente trabajo se ha empleado toda una serie de herramientas bioinformáticas con fines diferentes: i) la creación de árboles filogenéticos basados en el método de Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) empleando el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013); ii) la predicción de estructuras proteicas con el servidor Phyre2 (*Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0*) (Kelley *et al.*, 2015) y la edición de las mismas por Chimera 1.11.2 (Pettersen *et al.*, 2004); iii) la predicción de dominios proteicos empleando los servidores SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (Letunic & Bork, 2017) y Pfam 31.0 (*Protein families database of alignments and HMMs*) (Finn *et al.*, 2016); iv) la predicción de péptidos señal de proteínas secretadas dependientes de la vía Sec a través de los servidores SignalP4.0 (Petersen *et al.*, 2011), SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2005) y MatureP (Orfanoudaki *et al.*, 2017); v) la búsqueda de fagos a través del servidor PHAST (*PHAge Search Tool*) (Zhou *et al.*, 2011) y de operones de biosíntesis de metabolismo secundario mediante el servidor antiSMASH 3.0 (Weber *et al.*, 2015).

En cuanto al uso de bases de datos consultadas, destacamos las base de datos de enzimas proteolíticas MEROPS (Rawlings *et al.*, 2016), y de α/β hidrolasas ESTHER (*ESTerases and alpha/beta-Hydrolase Enzymes and Relatives*) (Lenfant *et al.*, 2013), o la base de datos de clasificación estructural de proteínas SCOP2 (*Structural Classification of Proteins*) (Andreeva *et al.*, 2014).

3.8. MUTAGÉNESIS

3.8.1. Obtención de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina

Debido a la ausencia de resistencias estables en las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* empleadas en este trabajo, fue necesario contar con algún fenotipo específico que nos permita seleccionar dichas cepas para la realización de la mutagénesis por intercambio alélico. Para ello, se procedió a la obtención de un mutante espontáneo de resistencia al antibiótico rifampicina. Para el aislamiento del mutante se utilizó la técnica de gradiente en placa empleando un gradiente de rifampicina de 0 a 100 µg/mL.

Las cepas se cultivaron a 25 °C en agitación durante 18 h en 5 mL de medio TSC-1 y se sembraron alícuotas de 0,1 mL en las placas con gradiente de rifampicina, incubándolas a 25 °C durante 36 h. Las colonias obtenidas se sembraron en una nueva placa de gradiente de rifampicina para estimar el grado de resistencia al antibiótico y se incubaron de nuevo a 25 °C durante 36 h.

3.8.2. Mutagénesis por intercambio alélico

La obtención de mutantes por intercambio alélico de los genes a estudiar se llevó a cabo mediante la técnica “*knock-out*”. Esta técnica nos permite intercambiar la copia nativa del gen a mutar por una que contiene una delección en la región central del gen. En primer lugar se amplificaron por PCR aproximadamente 2 Kb de los extremos 3' y 5' de cada gen conteniendo las regiones flanqueantes, empleando el *KAPA HIFITM PCR Kit* (Kapa Biosystem), de modo que al pegar cada extremo obtengamos una mutación no polar por delección de gran parte de la secuencia codificadora del gen. A cada uno de los cebadores empleados en la reacción de PCR se le añadió a modo de adaptador la secuencia diana de una enzima de restricción que garantizase la correcta orientación de los fragmentos. Los adaptadores 2 y 3 contienen igual diana de restricción, lo que asegura que la construcción se realiza en la orientación adecuada. Los cebadores empleados a lo largo de este trabajo, destinados a la construcción de los diferentes mutantes, se muestran en la Tabla III.6. Los dos fragmentos (región 3' y 5' de cada gen) se clonaron en el plásmido

pWKS30 de modo secuencial utilizando la cepa de *E. coli* DH5 α . La construcción se liberó del pWKS30 con *NotI*-*ApaI* y se ligó al vector suicida pNidKan con marcador de resistencia a Kan (Mouriño *et al.*, 2004) cortado con las mismas enzimas. Este vector, como derivado de pCVD442, contiene el origen de replicación R6K que requiere el gen *pir* (por lo que es necesario almacenarlo en la cepa *E. coli* S17-1- λ *pir*) y el gen *sacB* que confiere sensibilidad a la sacarosa.

Cada construcción se conjugó desde *E. coli* S17-1- λ *pir* a *P. damsela* subsp. *damsela*. Volúmenes de 1 mL de cultivos de las cepas donadora y receptora previamente ajustados a una DO₆₀₀ de 1 se centrifugaron y las células se mezclaron conjuntamente en un volumen de 100 μ L de medio TSC-1. Dicha mezcla se dispensó en una placa de medio TSA preparado con agua de mar (20 g/L de TSA disuelto en agua de mar) y las células se dejaron conjugando durante 2-3 días a 25 °C. Tras el periodo de conjugación, se seleccionaron en placas de TSA-1 con kanamicina las colonias de *P. damsela* subsp. *damsela* en las que la construcción se había integrado en su genoma por recombinación homóloga. La principal característica del plásmido utilizado es su incapacidad de replicarse en *P. damsela* al carecer del gen *pir*, de manera que solamente se perpetuará cuando se integre en el genoma bacteriano por un proceso de recombinación entre secuencias homólogas.

Es necesario un segundo evento de recombinación para que se libere el plásmido suicida, y con ello arrastre la copia completa del gen, dejando en su lugar la copia delecionada. Una vez integrada la construcción en el cromosoma, aproximadamente el 50% de los casos la segunda recombinación sucederá en la misma región, y en estos casos se libera el plásmido suicida junto con la copia delecionada. En el otro 50% de los casos, la recombinación se producirá en el otro fragmento, con lo que el vector arrastrará la copia intacta del gen, dejando la copia delecionada en el cromosoma. Tras realizar unos 5 pases en TSC-1, sin presión selectiva para la resistencia del plásmido suicida, se cultivaron diluciones decimales seriadas en placas de TSA-1 suplementadas con 15% de sacarosa. Las bacterias capaces de formar colonias son aquellas que han perdido el plásmido suicida y con ello el gen *sacB*. Se comprueba mediante PCR qué colonia es

revertiente y cuál es mutante (Fig. III.3). Habitualmente se utilizan los cebadores que amplifiquen aproximadamente la zona delecionada, con lo que los mutantes producirán productos de PCR más pequeños que el gen nativo, mientras que los revertientes mostrarán tamaños correspondientes al gen nativo. El mecanismo de obtención de mutantes por intercambio alélico se esquematiza en la Fig. III.4.

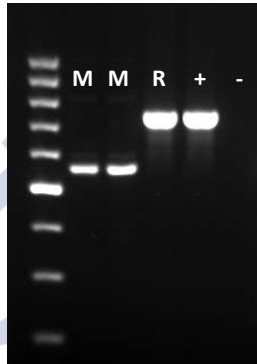


Fig. III.3: Comprobación de mutantes por intercambio alélico mediante amplificación por PCR de la zona delecionada: (R) revertiente, (M) mutante, (+) control positivo (ADN genómico), (-) control negativo.

Tabla III.6: Cebadores empleados para la construcción de los mutantes por intercambio alélico indicados (delec. = delecionadas).

Cebador	Secuencia 5´-3´ ^a	pb gen/pb delec.
Mutante del gen <i>hlyA_{cr}</i> :		
LD07_hlyAcr_BamHI_1	GCGGATCCGAAGACGTTAATGAATGCGT	1.809/874
LD07_hlyAcr_EcoRI_2	GCGAATTCTCTGCTATCGGAGTATACAT	
LD07_hlyAcr_EcoRI_3	GCGAATTCTACAAAGCATCTCCTAATGA	
LD07_hlyAcr_XhoI_4	GCCTCGAGGCTTCGAACATTTTCTTACA	
Mutante del gen <i>plpV</i> :		
plpV_XbaI_1	GCTCTAGACACACTGCCGCCACTGCTCT	1.218/833
plpV_EcoRI_2	GCGAATTCTATAATAACTACCATCACTG	
plpV_EcoRI_3	GCGAATTCTTCCATAACATTAAAGATGC	
plpV_XhoI_4	GCCTCGAGTCATTGAATATGGCCAAAGT	
Mutante del gen <i>colP</i> :		
colP_XbaI_1	GCTCTAGATCTTGCAATATCTCCACAGA	2.403/626
colP_BamHI_2	GCGGATCCGTAATGGCCTTGACGAGATA	
colP_BamHI_3	GCGGATCCAGATAATCAAGGTAATGTTG	
colP_EcoRI_4	GCGAATTCGTACCTGAATGTGCTGAAGC	
Mutante del gen <i>lip80</i> :		
mut_lipasa_1_XhoI	GCCTCGAGTTAGTCCTCTTCGTGGCGCT	2.397/1211
mut_lipasa_2_SalI	GCGTCGACACTTGACAGGATCTAACGGCT	
mut_lipasa_3_SalI	GCGTCGACTGGCAATGAAGTTGCAGATC	
mut_lipasa_4_SmaI	GCCCCGGGAGGCGATATGTACCGGAATA	
Mutante del gen <i>epsL</i> :		
LD07_epsL_Mut1_XbaI	GCTCTAGAGTCGCGAATAAATAACCTAC	1.254/525
LD07_epsL_Mut1_BamHI	GCGGATCCGCCAATAAGCCATTTTACTG	
LD07_epsL_Mut3_BamHI	GCGGATCCGCTATTGCAGCAGGTTTAGT	
LD07_epsL_Mut4_XhoI	GCCTCGAGGCTGATAAAGCACTTTCCCC	
Mutante del gen <i>pilD</i> :		
pilD_mut1_XbaI	GCTCTAGACTGGACACTTAGTGCTATCG	879/787
pilD_mut2_BamHI	GCGGATCCGCTGCCTACCAATAAGCCAA	
pilD_mut3_BamHI	GCGGATCCAGTCTATTGTGGGGACACTC	
pilD_mut4_EcoRI	GCGAATTCACATATCCTCAGACCAACCG	

^aLa secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador

3. MATERIAL Y MÉTODOS

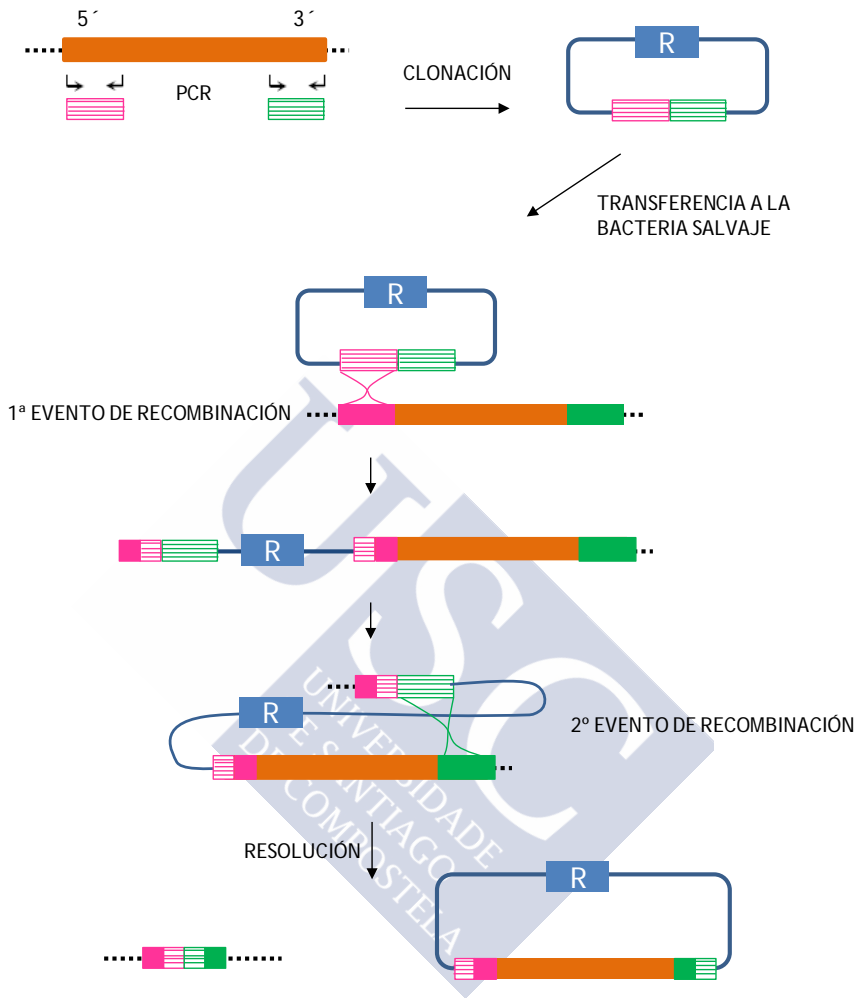


Fig. III.4: Esquema del proceso de mutación por intercambio alélico: El alelo mutante se obtiene amplificando las regiones 5' y 3' del gen, y uniendo ambos fragmentos en un mismo plásmido que facilitará la transferencia de la copia delecionada a la bacteria. Tras un primer evento de recombinación, el plásmido se inserta en el cromosoma bacteriano. Las colonias recombinantes son seleccionadas en base al marcador de resistencia a antibiótico del plásmido (R). Tras sucesivos ciclos de división se selecciona una segunda recombinación en la que, teóricamente, en un 50% de los casos el plásmido se libera del cromosoma y arrastra consigo la copia salvaje del gen. Una vez libre en el citoplasma, el vector se perderá en el momento de la división celular ya que, debido a su origen de replicación R6K, es incapaz de autoreplicarse en la bacteria. El resultado final de todo el proceso es la sustitución cromosómica del gen por su copia delecionada.

3.8.3. Mutagénesis por transposición del mini-Tn10

La mutagénesis mediante el transposón mini-Tn10 se realizó empleando el plásmido conjugativo suicida pLOFKm, que contiene el gen de la transposasa IS10R bajo el control del promotor P_{tac}-inducido por IPTG, así como un gen de resistencia a kanamicina flanqueado por elementos móviles (Fig. III.5). El elemento transponible utiliza un mecanismo no replicativo.

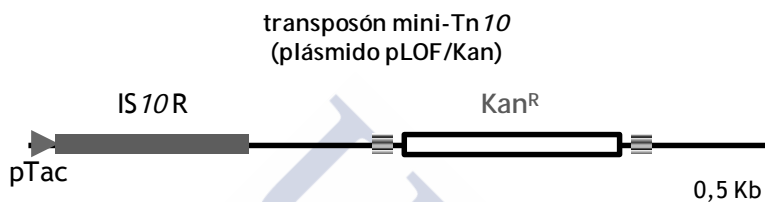


Fig. III.5: Sección del plásmido pLOF/Kan portadora del transposón mini-Tn10. Imagen elaborada tomando como referencia la información procedente de Herrero *et al.* (1990).

3.8.3.1. Conjugación de *P. damsela* subsp. *damsela* con mini-Tn10 y activación de la transposasa

Para la conjugación se añadieron 0,1 mL de la mezcla de la cepa donadora (*E. coli* mini-Tn10 cultivada a 37 °C durante 5 h en LB líquido y en agitación a 150 rpm) y la cepa receptora (*P. damsela* subsp. *damsela* LD-07 cultivada a 25 °C durante 12 h en TSC-1 y en agitación a 150 rpm), con 10 µL de IPTG (activa la expresión de la transposasa una vez que se encuentra en la célula receptora), en una placa de TSA preparado con agua de mar. La conjugación se incubó durante 3 días a 25 °C. Transcurrido el tiempo establecido, se sembraron diluciones seriadas de la mezcla de células en placas de LB con kanamicina, antibiótico marcador de la inserción del mini-Tn10.

3.8.3.2. Clonación y secuenciación de las zonas adyacentes al transposón Tn10

Para poder secuenciar las zonas del genoma de *P. damsela* subsp. *damsela* que flanquean el gen de resistencia a kanamicina, el cual funciona como marcador de la inserción mini-Tn10, se digirió parcialmente el ADN de las cepas mutantes con la enzima de restricción *BfuCI* (Thermo Fisher Scientific) durante 1 min. A

continuación se ligó, mediante el uso de ADN ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific), al plásmido pUC118 previamente cortado con *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific) y tratado con fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Cabe destacar que los extremos originados por la acción de *Bfu*CI y *Bam*HI son compatibles y por lo tanto se van a ligar. A continuación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α . Las colonias que contenían el fragmento clonado con el transposón mini-Tn10 se seleccionaron sembrando la electroporación en placas de LB suplementado con kanamicina. Empleando los cebadores universales M13, se amplificaron los fragmentos clonados, secuenciando aquéllos que presentaban un tamaño superior a 1.800 pb (gen de resistencia a kanamicina flanqueado por elementos móviles). Posteriormente, se realizaron predicciones de ORFs y búsqueda de homologías.

3.9. COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES CON EL GEN SALVAJE

Para complementar los genes mutados se empleó el plásmido pBBR1MCS-5 (Fig. III.6) (Kovach *et al.*, 1995). En las complementaciones se amplificó el gen completo, incluyendo la región promotora, y se clonó en el vector gracias a adaptadores añadidos a la secuencia de los cebadores (Tabla III.7). pBBR1MCS-5 no es un vector de expresión, por lo que debemos incluir un promotor funcional con el gen, así que decidimos amplificar los genes con sus propios promotores para conservar el patrón de expresión natural, excepto en el mutante para el gen *epsL*, en el que se clonó la secuencia promotora de *hlyA_{cr}*. Las construcciones se electroporaron en la cepa *E. coli* S-17- λ pir, tras lo cual se introdujeron por conjugación en las cepas de *P. damsela*e subsp. *damsela*e defectivas para el gen determinado, seleccionando la cepa receptora por su resistencia a rifampicina y gentamicina, siendo esta última la resistencia conferida por el plásmido de clonación pBBR1MCS-5. Por último, el plásmido recombinante se aisló de *P. damsela*e y se digirió con las enzimas incluidas en los adaptadores verificándose de este modo la presencia

del inserto, llegando en el caso de la comparación entre las PhlyC de las cepas LD-07 y RM-71 a secuenciar los insertos clonados. Los datos obtenidos con las cepas complementadas no son comparables cuantitativamente a la cepa salvaje ya que el gen introducido está en un número de copia diferente al resto de genes del sistema nativo. Los genes complementados y los cebadores utilizados se muestran en la Tabla III.7.

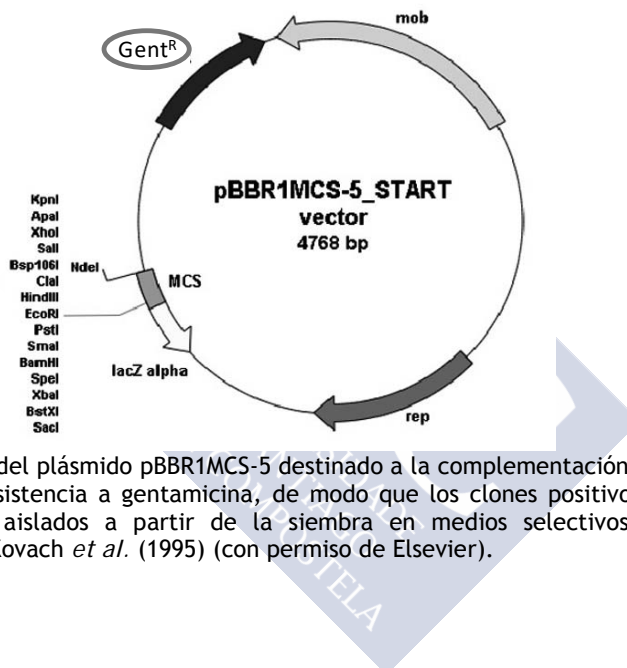


Fig. III.6: Mapa del plásmido pBBR1MCS-5 destinado a la complementación de cepas mutantes de resistencia a gentamicina, de modo que los clones positivos pueden ser fácilmente aislados a partir de la siembra en medios selectivos. Imagen procedente de Kovach *et al.* (1995) (con permiso de Elsevier).

Tabla III.7: Lista de cebadores empleados para complementar los mutantes de los genes indicados.

Cebador	Secuencia 5' - 3'	pb amplif.
<i>promotor + hlyA_{cr}</i> de LD-07:		
hlyAcr_LD07_BamHI_F	GCGGATCCAGTCCTTCATCAGTGTAGGC	2.500
hlyAcr_LD07_BamHI_R	GCGGATCCAATATCGCTAATAATCATAA	
<i>promotor + hlyA_{cr}</i> de RM-71:		
hlyAcr_RM71_BamHI_F	GCGGATCCTTACGACAAATATTAGATAG	2.490
hlyAcr_RM71_BamHI_R	GCGGATCCCGCTAGAACTTAATGTCAC	
<i>promotor + plpV</i>:		
prom_plpV_BamHI_F	GCGGATCCGAACCTAATGCGACAACTAA	1.854
plpV_compl_BamHI_R	GCGGATCCGGTTGATGCCTCTTACGCAC	
<i>promotor + colP</i>:		
prom_colP_BamHI_F	GCGGATCCGAAAGTTGAACAGCAGCATT	2.669
colP_compl_BamHI_R	GCGGATCCAATTACAGCGTAATCAACGT	
<i>promotor + fadL₊ lip80</i>:		
prom_lip80_BamHI_F	GCGGATCCACAGAACGTACTGCTGAAC	4.100
compl_lip80_BamHI_R	GCGGATCCGTTTGATGCTTTATCTAGAG	
<i>promotor hlyA_{cr} + epsL</i>:		
prom_hlyAcr_BamHI_F	GCGGATCCAGTCCTTCATCAGTGTAGGC	683
prom_hlyAcr_EcoRI_R	GCGAATTCTCTGCGCCTGTAGAATAATT	
compl_epsL_EcoRI_R	GCGAATTCAGGTGACGGTTGTTCTGTCGC	1.359
compl_epsL_BamHI_F	GCGGATCCCTCACGTTGGCTTAAGGAT	
<i>promotor + pilD</i>:		
prom_pilD_BamHI_F	GCGGATCCTGATAACCTCGGCCAAAT	1.246
compl_pilD_BamHI_R	GCGGATCCAAACAGATTGGCAACCGTGG	

^aLa secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en el cebador

3.10. EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES: TÉCNICA DEL CELOFÁN

Para obtener los productos extracelulares (ECPs) de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, se extendieron 100 µL procedentes del correspondiente cultivo en TSB-1 ajustado a una DO₆₀₀ de 1, sobre placas de TSA-1 cubiertas con celofán estéril empleando un hisopo de algodón estéril siguiendo el protocolo establecido por Liu (1957) (Fig. III.7). Después de incubar durante 48 horas a 25 °C, se retiraron las células bacterianas del celofán con un volumen mínimo de solución salina (0,85% de NaCl (p/vol)). Las suspensiones celulares se centrifugaron dos veces a 13.000 rpm durante 5 min, y los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de 0,22 µm de poro

(Millipore). Todo el proceso de extracción se realizó manteniendo los tubos en hielo. Las concentraciones totales de proteínas se determinaron de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, 1976), siendo éstas estandarizadas después de la medición. Una vez obtenidos los ECPs se alicuotaron en volúmenes de 50 μ L y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.



Fig. III.7: Crecimiento bacteriano sobre placa de TSA-1 cubierta con celofán estéril para la obtención de los productos extracelulares.

3.11. OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES A PARTIR DE CULTIVOS BACTERIANOS

Los sobrenadantes de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* a analizar procedieron de cultivos celulares que habían alcanzado la DO₆₀₀ deseada. Las suspensiones celulares se centrifugaron dos veces a 13.000 rpm a 4 °C durante 5 min, con el fin de eliminar las células bacterianas. Posteriormente, y empleando membranas de 0,22 μ m de poro (Millipore), se filtraron y se dispensaron en tubos eppendorf. Los sobrenadantes se mantuvieron en hielo hasta su uso.

3.12. ENSAYOS ENZIMÁTICOS: HIDRÓLISIS DE MACROMOLÉCULAS

3.12.1. Ensayos de actividad hemolítica

A la hora de estudiar la actividad hemolítica de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* y sus derivados, se siguieron dos métodos diferentes. El primero de ellos consistió en un método cualitativo basado en el tamaño de los halos hemolíticos en placas de agar suplementadas con sangre al 5%, mientras que el segundo es un

método cuantitativo, dado que medimos en el espectrofotómetro la cantidad de hemoglobina liberada en una suspensión de eritrocitos.

3.12.1.1. Medición de la actividad hemolítica en placas de agar sangre

Las placas de agar sangre se elaboraron añadiendo bajo condiciones asépticas sangre de oveja, conejo o trucha al medio de cultivo TSA-1 hasta alcanzar una concentración final del 5% (v/v). Además, en los experimentos en los que fue requerido también se añadió emulsión de yema de huevo comercial (Oxoid) hasta una concentración final del 5% (v/v). Las placas de sangre de oveja se adquirieron comercialmente (Oxoid). La determinación de la actividad hemolítica mediante este método cualitativo, consiste en la detección de un halo de degradación transparente alrededor de la colonia, en el caso de ser positiva, o ausencia del mismo, ante un resultado negativo (Fig. III.8). Para ello, se sembró una colonia de cada cepa en cuestión con la base redonda de un palillo de madera en una placa de agar sangre, en algunos casos, y en otros se añadieron 5 μ L de un cultivo en TSC-1 de DO_{600} de 1. En el caso del estudio de la actividad hemolítica de productos extracelulares o sobrenadantes, se añadieron 5 μ L de los mismos sobre la placa de agar sangre. La placa se incubó durante 24 horas a 25 °C y se midió el halo de hemólisis originado. Definimos el tamaño del halo de hemólisis como la distancia que existe entre el borde externo de la zona de crecimiento bacteriano y el extremo de la zona hemolizada.

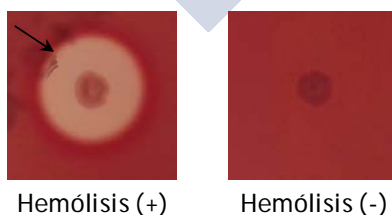


Fig. III.8: A la izquierda, cepa bacteriana con actividad hemolítica detectada por la presencia de halo de degradación en TSA-1 suplementado con sangre. A la derecha, cepa bacteriana sin actividad hemolítica.

3.12.1.2. Medición de la actividad hemolítica a partir de productos extracelulares o sobrenadantes

Para la realización de este ensayo fue necesario disponer de los productos extracelulares o de los sobrenadantes de las cepas a ensayar mediante las técnicas anteriormente descritas. Los ensayos de hemólisis se realizaron empleando eritrocitos de oveja (Oxoid) y conejo (Oxoid) y placas de 96 pocillos. Los eritrocitos se lavaron varias veces con PBS (pH 7,4) mediante centrifugación (3.000 rpm/5 min/4 °C) para obtener una suspensión de eritrocitos libre de hemoglobina al 5%. En placas de 96 pocillos de fondo cóncavo, se realizaron diluciones $\frac{1}{2}$ de los diferentes productos extracelulares o sobrenadantes, y se mezclaron 50 μ L de cada dilución con 50 μ L de sangre al 5%. Una vez mezclados se incubaron durante el tiempo estimado para el experimento a 25 °C. Posteriormente se centrifugó a 800 rpm/5 min/4 °C, se tomaron 10 μ L de cada sobrenadante y se pasaron a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano, añadiendo además 90 μ L de PBS por pocillo. La determinación del grado de lisis de los eritrocitos, y por consiguiente la cantidad de hemoglobina liberada, se realizó midiendo en un espectrofotómetro la absorbancia a 405 nm de la anterior mezcla (Fig. III.9). Como control negativo se utilizaron 100 μ L de PBS y como control positivo 100 μ L de agua destilada. Se realizaron un total de 3 réplicas.

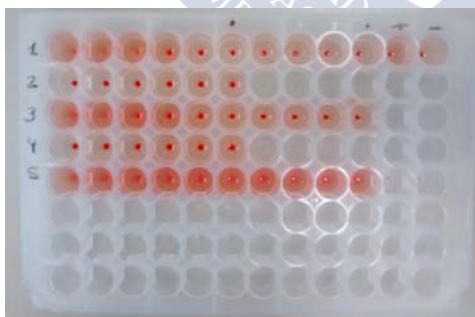


Fig. III.9: Muestras preparadas para la medición espectrofotométrica de la cantidad de hemoglobina liberada en los ensayos de hemólisis en líquido con productos extracelulares de *P. damselae* subsp. *damselae*. Nótese la disminución de la hemoglobina liberada a medida que aumentamos la dilución (de izquierda a derecha).

3.12.2. Ensayos de actividad lipolítica

3.12.2.1. Ensayos de actividad lipasa/esterasa: hidrólisis de tween 80 y tween 20

La capacidad para hidrolizar el tween 80 (monooleato de polioxietilen(20)sorbitano) y tween 20 (monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano) se ha determinado según el método de Sierra (1957). Este ensayo pone de manifiesto la capacidad de las bacterias para liberar los ácidos oleico y láurico contenidos en el tween 80 y 20, respectivamente (Fig. III.10A). Para ello, los microorganismos se hacen crecer en placas de TSA-1 suplementadas con tween 80 (Sigma) o tween 20 (Sigma) al 1%, y se incubarán durante 2 o 3 días a 25 °C, leyéndose los resultados a partir de las 24 horas. Si el microorganismo es capaz de hidrolizar el medio tween, aparecerá en el medio de cultivo un precipitado alrededor del crecimiento bacteriano debido a la precipitación de los ácidos grasos liberados por la hidrólisis (Fig. III.10B). Cuando la bacteria no posee la capacidad para hidrolizar el tween no se observa ningún tipo de precipitado.

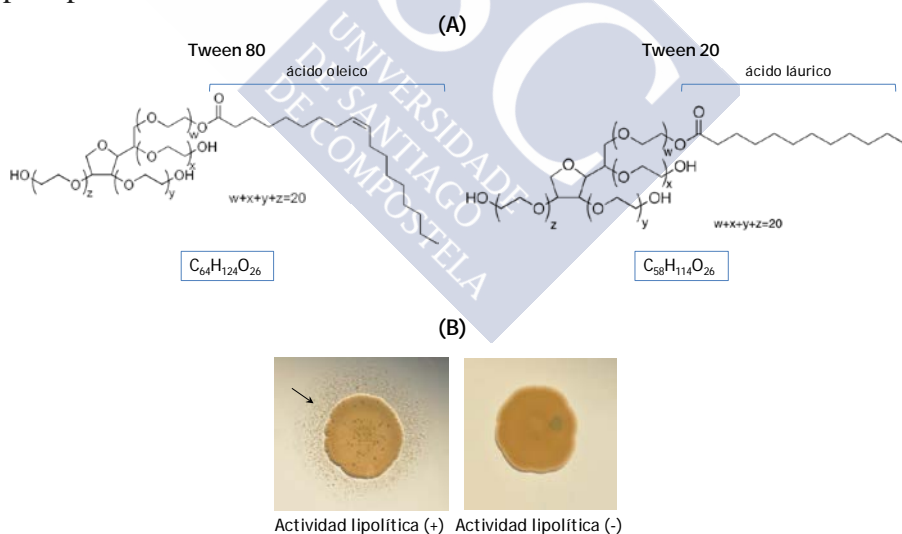


Fig. III.10: (A) Estructura y fórmulas del tween 80 y el tween-20. (B) A la izquierda, bacteria con actividad lipolítica positiva detectable por la presencia de precipitado en TSA-1 suplementado con tween 80 o 20. A la derecha, bacteria sin actividad lipolítica.

3.12.2.2. Ensayos de actividad fosfolipasa

A la hora de estudiar la capacidad fosfolipasa de las diversas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* y sus derivados, se siguió un método cualitativo basado en la medición de un halo de precipitado que aparece tras incubar una cepa positiva para este carácter en un medio con fosfolípidos aportados por la yema de huevo incorporada al mismo (Fig. III.11). Las placas para la detección de la actividad fosfolipasa se elaboraron con TSA-1 suplementadas con extracto de yema de huevo comercial (Oxoid) al 3%. Para determinar la capacidad de hidrolizar fosfolípidos, sembramos una colonia de cada cepa con la base de un palillo de madera en una placa de TSA-1 con yema de huevo. En otro casos, añadimos 5 μL de un cultivo de la cepa a estudiar ($\text{DO}_{600}=1$). En el caso del estudio de la actividad fosfolipasa de los productos extracelulares, se añadieron 10 μL de los mismos. Las placas se incubaron durante 24 horas a 25 °C y se midieron los halos de precipitado originados. Definimos el tamaño del halo de precipitado como la distancia que existe entre el borde externo de la zona de crecimiento bacteriano y el extremo de la zona hidrolizada.

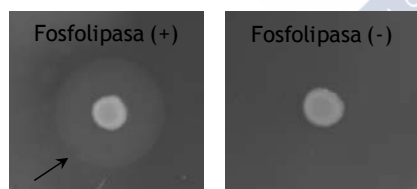


Fig. III.11: A la izquierda, cepa bacteriana con actividad fosfolipasa detectada por la presencia de un halo de precipitado en TSA-1 con emulsión de yema de huevo. A la derecha, cepa bacteriana sin capacidad fosfolipasa.

3.12.3. Ensayos de actividad proteolítica

3.12.3.1. Ensayos de actividad caseinasa: hidrólisis de caseína

Con la finalidad de detectar la actividad proteolítica en bacterias, estos microorganismos se hacen crecer en un medio que contiene caseína y que consta de dos fracciones: i) TSA-1 y ii) leche desnatada en polvo (40 g/L). La lectura de la prueba se realiza observando la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, cuando la bacteria es capaz de hidrolizar la caseína, y ausencia del mismo ante la ausencia de hidrólisis (Fig. III.12). El periodo de incubación para las cepas objeto de estudio fue de 24 horas a 25 °C.

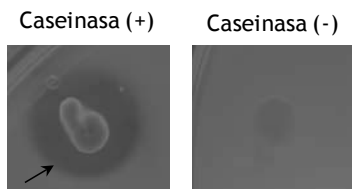


Fig. III.12: A la izquierda, cepa bacteriana con actividad caseinasa positiva detectable por la presencia de halo de degradación en TSA-1 suplementado con leche desnatada. A la derecha, cepa sin actividad caseinasa.

3.12.3.2. Ensayos de actividad gelatinolítica y colagenolítica

3.12.3.2.1. Actividad gelatinasa: hidrólisis de gelatina

Para la detección de la actividad gelatinasa, las cepas bacterianas se inocularon en placas de TSA-1 suplementadas al 3% con gelatina comercial (Oxoid). Tras su incubación durante 48 horas a 25 °C se procedió al revelado por adición de cloruro de mercurio al 12,5% (p/v). Tras un periodo de tiempo, y empleando un fondo oscuro, vislumbraremos un precipitado blanco que indica la presencia de la gelatina no hidrolizada. Por el contrario, la ausencia del precipitado en la región de crecimiento bacteriano apunta a la hidrólisis de la gelatina (Fig. III.13).

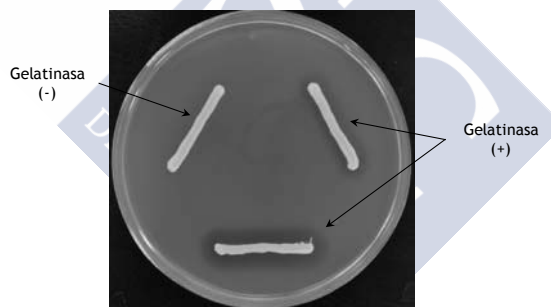


Fig. III.13: Cepas bacterianas con actividad gelatinolítica positiva detectable por la presencia de halo de degradación, y cepa bacteriana sin actividad gelatinasa en TSA-1 suplementado con gelatina.

3.12.3.2.2. Actividad colagenasa: hidrólisis del péptido sintético FALGPA

La medición cuantitativa de la actividad colagenolítica se realizó determinando la hidrólisis del péptido sintético FALGPA (2-furanacryloyl-Leu-Gly-Pro-Ala). La cuantificación de la hidrólisis de FALGPA se realizó midiendo en un espectrofotómetro la absorbancia a 345 nm según el protocolo descrito por Van Wart & Steinbrink

(1981). FALGPA es considerado como un péptido sintético idóneo y específico para el estudio de las colagenasas bacterianas (Lim *et al.*, 1995). Este péptido es hidrolizado más rápidamente por la colagenasa que cualquier otro sustrato sintético comúnmente utilizado, pero no es escindido por ninguna de las proteasas conocidas como tripsina, termolisina o elastasa (Van Wart & Steinbrink, 1981). La hidrólisis de FALGPA en el enlace Leu-Gly por la colagenasa a FAL y Gly-Pro-Ala da como resultado una disminución de la absorbancia a 345 nm (Fig. III.14). La mezcla de reacción consistió en 1 mM de FALGPA (Sigma) en Tricina 50 mM, NaCl al 400 mM, y 10 mM de CaCl_2 (pH 7.5). Esta prueba se repitió un total de tres veces para garantizar que los resultados fueran reproducibles.



Donde:

FALGPA = N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala
 FAL = N-(3[2-Furyl]acryloyl)-Leu

Fig. III.14: Reacción en la que se basa la determinación espectrofotométrica (345 nm) de la actividad colagenasa.

3.13. ENSAYOS DE VIRULENCIA EN LUBINA

Con el fin de llevar a cabo los ensayos de virulencia en lubina, se utilizaron alevines de aproximadamente 6 g de peso. Previamente al ensayo, los peces se aclimataron durante 24 h al ambiente de ensayo para evitar posibles episodios de estrés. La temperatura del agua se estableció en 24 °C. La preparación de los inóculos se realizó a partir de cultivos frescos de 12 h en TSA-1, resuspendiendo las células en solución salina (0.85% (p/v)) y ajustando las densidades celulares a una DO_{600} de 1,5. La determinación del número de bacterias inyectadas en el inóculo se realizó mediante la siembra en placas de TSA-1 de diluciones decimales seriadas en solución salina de la suspensión inicial. Se inocularon intraperitonealmente 0,1 mL por pez ($2,5 \times 10^6$ UFC/pez), empleando 10 peces por cada dosis. Como control negativo se inocularon 10 peces intraperitonealmente con solución salina.

Los peces se observaron diariamente a lo largo de 7 días tras la inoculación. Se analizaron todos los peces muertos y en todos los casos se obtuvieron cultivos puros del riñón, confirmando la presencia

de *P. damselae* subsp. *damselae* mediante la amplificación del gen *ureC* (Ure-5: TCCGGAATAGGTAAAGCGGG; Ure-3: CTTGAATATCCATCTCATCTGC; tamaño de amplificación = 448 pb) (Osorio *et al.*, 2000b), y comprobando así que las mortalidades eran causadas por las bacterias inoculadas. El grado de virulencia de expresó como porcentaje de supervivencia. El protocolo de experimentación con animales utilizados en este estudio (Código de procedimiento 15004/14/003) ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidade de Santiago de Compostela.

3.14. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

La línea epitelial de pez EPC (epitelioma papuloso de carpa) (Fijan *et al.*, 1983) se cultivó en medio mínimo esencial Eagle (EMEM) con sales Earle y suplementada con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (FBS, Lonza) y penicilina (100 IU mL^{-1}), en un incubador a 25°C . La línea celular de queratinocitos humanos HaCaT (Boukamp *et al.*, 1988) se cultivó en medio Dulbecco modificado del medio Eagle (DMEM)/F-12 GlutaMAX-I suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de tampón HEPES y 1% de penicilina-estreptomicina en un incubador humificador con 5% de CO_2 a 37°C . En lo relativo a las células fibroblásticas de pez cebra AB.9 (Badakov & Jazwinska, 2006), éstas se cultivaron en medio DMEM GlutaMAX-I con 15% de suero fetal bovino, 1% de tampón HEPES y 1% de penicilina-estreptomicina en un incubador humificador con 5% de CO_2 a 28°C . Todos los medios y aditivos proceden de la compañía Life Technologies. En la Fig. III.15 podemos observar la morfología y disposición en el tapiz de las líneas celulares empleadas.

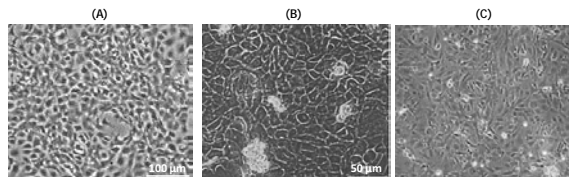


Fig. III.15: Disposición en el tapiz celular de las líneas celulares epiteliales EPC (A) y HaCaT (B), y fibroblástica AB.9 (C). Imágenes procedentes de ATCC (The Global Bioresource Center), Boukamp *et al.* (1988) (CC) y Badakov & Jazwinska (2006) (con permiso de Springer Nature).

3.15. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

3.15.1. Microscopía óptica: efectos sobre el tapiz y morfología celulares

Este ensayo de citotoxicidad se realizó mediante el protocolo descrito por Wang *et al.* (1998). Para este ensayo de citotoxicidad, se prepararon placas de 12 pocillos de cultivos de células EPC y se incubaron a 20 °C hasta alcanzar la confluencia celular. Cada cepa bacteriana a ensayar se cultivó en placas de TSA-1. Tras 12 horas de incubación a 25 °C se resuspendieron las células bacterianas en solución salina (0,85% de NaCl) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1,5, y se añadieron 0,2 mL de cada suspensión bacteriana a las células EPC. Como control negativo se utilizó solución salina. Cada experimento se realizó por triplicado. El desarrollo de los efectos citotóxicos se observó después de 6, 24 y 48 horas después de la inoculación empleando un microscopio de contraste de fase invertido (Nikon) con un aumento de 200x.

3.15.2. Ensayos de azul de tripán

El azul de tripán (AT) es una molécula polar, cuya carga eléctrica y tamaño le impiden atravesar las membranas celulares intactas, pero puede penetrar en el interior celular cuando la integridad de éstas sea alterada por un elemento tóxico (Fig. III.16A). El ensayo de tinción por exclusión mediante el colorante AT (Ehrlich & Shiga, 1904), corresponde al recuento de células eucariotas que no son capaces de incorporar el susodicho colorante tras la incubación de éstas con una sustancia citotóxica (Fig. III.16B).

Para la realización de este experimento fue necesario en primer lugar sembrar las células HaCaT y AB.9 en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo e incubarlas durante 24 horas a 37 °C y 25°C, respectivamente. Después del tiempo de incubación, el medio de cultivo se reemplazó por medio que contenía la cepa bacteriana a estudiar (MOI (multiplicidad de infección) de 1:50), manteniendo las infecciones a 37 °C (HaCaT) y 28 °C (AB.9) durante 90 min. Posteriormente, el medio se intercambió con medio fresco y colorante azul de tripán a una proporción de 1/2, dejando incubar la mezcla durante 10 min. A continuación, las células se lavaron

3. MATERIAL Y MÉTODOS

cuidadosamente con PBS. El recuento de células teñidas por el colorante azul de tripán y las no teñidas se realizó visualmente empleando la cámara de Neubauer. Cada pocillo ensayado se dividió en cuadrantes, y se obtuvieron valores medios de cuatro recuadros individuales de 100 células. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

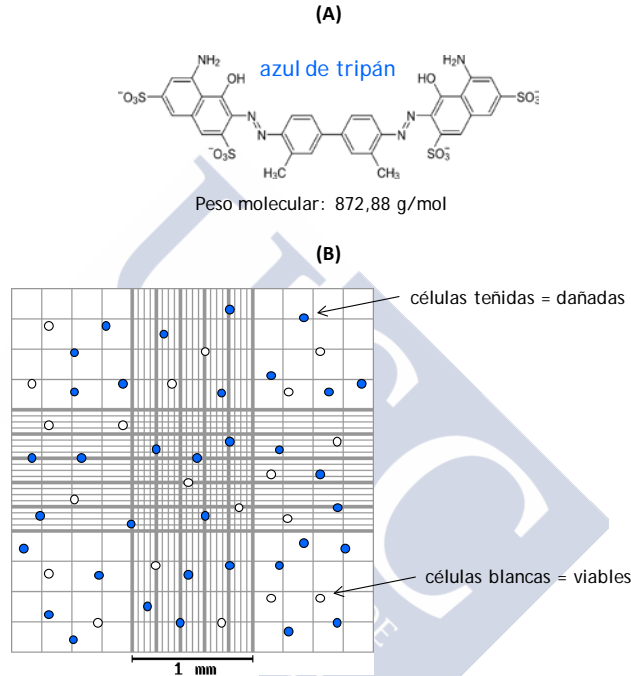


Fig. III.16: (A) Molécula del colorante azul de tripán. Por su tamaño y carga la molécula de azul de tripán no es capaz de interiorizarse en las células eucariotas cuyas membranas citoplasmáticas están intactas. (B) Representación esquemática de la cámara de Neubauer con células dañadas que permiten la entrada del colorante, y células viables sin teñir, tras su exposición con una sustancia tóxica.

3.15.3. Ensayos de ATP celular

El ATP sirve como el principal donador inmediato de energía y está presente en todas las células metabólicamente activas. El ATP se ha utilizado como una herramienta para medir la integridad funcional de las células vivas, ya que todas las células requieren de ATP para permanecer con vida y llevar a cabo su especialización funcional. La mayoría del ATP se encuentra dentro de las células vivas y vincula

procesos catabólicos y anabólicos (Hipler, 2007). Una lesión celular produce una disminución rápida del ATP citoplasmático, dado que cuando las células pierden la integridad de la membrana, pierden la capacidad de sintetizar ATP y las ATPasas endógenas agotan rápidamente cualquier ATP restante en el citoplasma (Riss *et al.*, 2016) (Fig. III.17B). La medición del ATP es, por tanto, fundamental para el estudio de los procesos vitales. Se han utilizado muchos métodos para la determinación de ATP, pero ahora la técnica más exitosa es el método bioluminiscente, debido a su sensibilidad (Hipler, 2007). El uso de la luciferasa de luciérnagas es el método más comúnmente aplicado para estimar el número de células viables, así como el más sensible y menos propenso a los artefactos que otros métodos de análisis de viabilidad (Riss *et al.*, 2016). El reactivo de detección de ATP contiene detergente para la lisis celular, inhibidores de ATPasa para estabilizar el ATP que se libera de las células lisadas, luciferina como sustrato y la forma estable de luciferasa para catalizar la reacción que genera los fotones de luz (Riss *et al.*, 2016). Un esquema simplificado de la reacción se muestra en la Fig. III.17A.

En los ensayos de ATP celular, se sembraron en primer lugar las células HaCaT y AB.9 en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo y posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 25°C, respectivamente. Después del periodo de incubación, el medio de cultivo se sustituyó con los ECPs correspondientes diluidos (400 µg/mL) y con los controles del medio. Se incubó durante 90 min a las temperaturas idóneas para cada línea celular. La cantidad total de ATP celular presente en el lisado celular se midió luminométricamente empleando el ensayo basado en la luciferasa de luciérnaga tal y como ha sido descrito por Haugwitz y colaboradores (2006), y empleando el kit comercial *ATP Bioluminescence Assay kit CLS II* (ROCHE).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

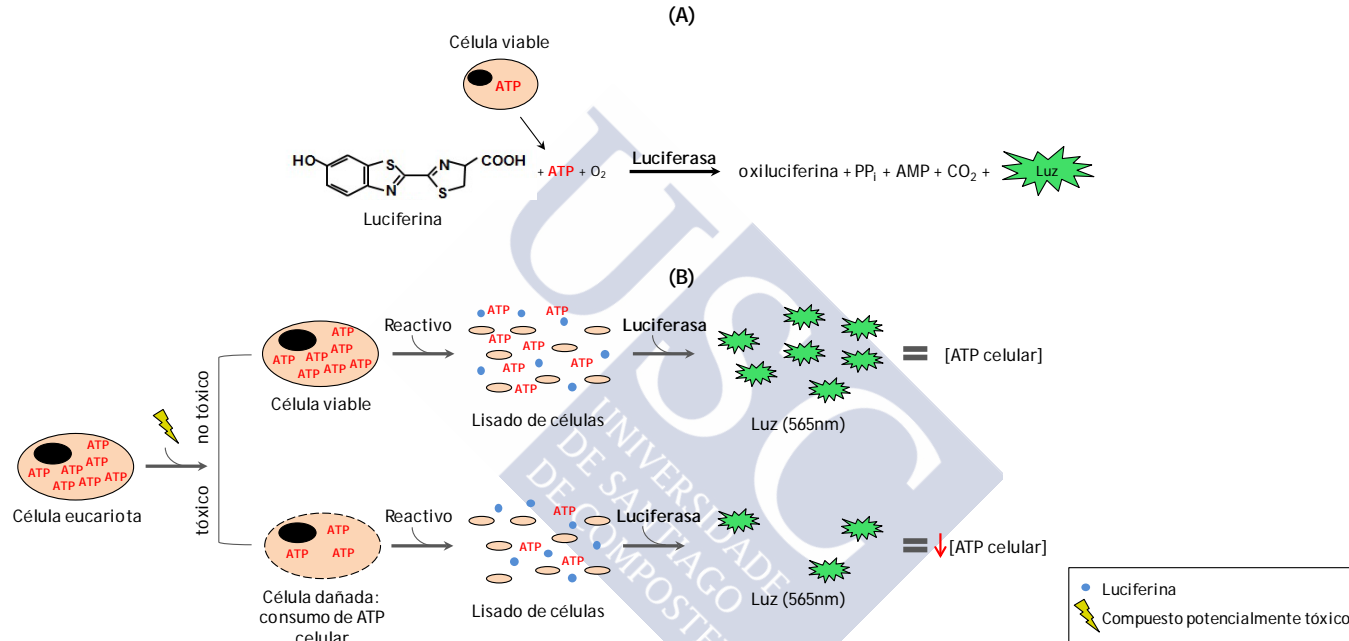


Fig. III.17: (A) Esquema de la reacción entre la luciferina y el ATP citoplasmático catalizada por la luciferasa, generando luz visible a 562nm. (B) Ante un compuesto potencialmente tóxico, podemos toparnos ante dos situaciones: que éste no sea tóxico, y por lo tanto no altere la integridad de la membrana celular, o que sea tóxico, desencadenando daño en la célula. La síntesis de ATP en la célula viable seguirá el curso normal, mientras que en la célula dañada ésta se abolirá, lo que llevará a la ATPasa a consumir el ATP citoplasmático que todavía hay. El reactivo de luciferasa contiene detergente para la lisis celular, luciferina como sustrato y luciferasa. La luciferasa ante la presencia de luciferina y ATP originará luz visible a 562nm. La cantidad de fotones es proporcional a la concentración de ATP celular. Según el daño celular ocasionado, la concentración de ATP citoplasmático variará.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN





4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. VIRULENCIA Y CITOTOXICIDAD DE LAS CEPAS DE *P. DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE* CARENTES DEL PLÁSMIDO DE VIRULENCIA pPHDD1

Como ya se ha mencionado en la introducción, en los últimos años *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido aislada como agente causal de enfermedad en nuevas especies de peces cultivados. Además, también se ha descrito su aislamiento en brotes de mortalidades en peces cultivados, en zonas geográficas donde no se había notificado previamente, tales como Egipto (Abdel-Aziz *et al.*, 2013), Túnez (Khouadja *et al.*, 2014) y el Mar Negro (Terceti *et al.*, 2016). Recientemente, se han identificado algunos de los principales factores relacionados con la virulencia de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*: la toxina formadora de poro fobalisina plasmídica (PhlyP) y la fosfolipasa con capacidad hemolítica damselisina (Dly), ambas codificadas en el plásmido pPHDD1; y la fobalisina cromosómica PhlyC (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013a, Rivas *et al.*, 2013b).

Si bien es cierto que los principales factores de virulencia se hallan circunscritos a un elemento móvil, Osorio *et al.* (2000a) ya habían demostrado que la presencia de *dly* no es un requisito para la patogenicidad de *P. damsela* subsp. *damsela*, por lo que la presencia de pPHDD1 tampoco lo es. Asimismo, la mayoría de las cepas de este patógeno aisladas recientemente de brotes en granjas acuícolas carecen de dicho plásmido (Labella *et al.*, 2010a; Rivas *et al.*, 2014; Terceti *et al.*, 2016), por lo que es necesario iniciar estudios destinados a esclarecer las bases genéticas de la virulencia de este tipo de cepas. Para ello, el primer paso a seguir consistió en comparar los grados de virulencia y citotoxicidad de una cepa de *P. damsela* subsp. *damsela* portadora del plásmido de virulencia pPHDD1 (∃ pPHDD1) y de una cepa carente del mismo (∄ pPHDD1).

4.1.1. Comparación del grado de virulencia entre las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* LD-07 (\nexists pPHDD1) y RM-71 (\exists pPHDD1)

Un estudio realizado por Fouz *et al.* (1993), ya había observado diferencias en los grados de virulencia entre cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, llegando incluso a clasificarlas en cepas muy virulentas, moderadamente virulentas y avirulentas, mucho tiempo antes de que pPHDD1 hubiese sido descrito. Para evaluar las diferencias en la virulencia para lubina entre una cepa sin plásmido y una cepa portadora de pPHDD1, se realizaron ensayos de virulencia por vía intraperitoneal (sección 3.13 de Material y Métodos), seleccionando los derivados resistentes al antibiótico rifampicina de la cepa LD-07 (AVL49) y de la cepa RM-71 (AR57), debido a su susceptibilidad a la modificación genética y facilitación en la selección después de los experimentos de conjugación (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013b). La obtención de los mutantes espontáneos a rifampicina se realizó acorde al protocolo indicado en la sección 3.8.1 de Material y Métodos.

Es necesario resaltar que los peces se aclimataron en tanques de 100 litros a 24 °C durante una semana antes de realizar el desafío, manteniendo esta temperatura durante todo el experimento. Las pruebas de virulencia se llevaron a cabo por inoculación vía intraperitoneal de suspensiones bacterianas en solución salina al 0,85%, empleando dos dosis de 1×10^5 UFC/pez y $2,5 \times 10^6$ UFC/pez e infectando un total de 10 lubinas por cepa a ensayar. Además, la mortalidad de los peces se registró diariamente durante 8 días post-inoculación, y se aislaron en TSA-1 y TCBS las cepas inoculadas a partir de los riñones de los peces muertos (Fig. IV.2), resultando las colonias aisladas positivas para la PCR del gen *ureC* específico de la subespecie con los cebadores *ureC*-5' y *ureC*-3' (Osorio *et al.*, 2000b).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

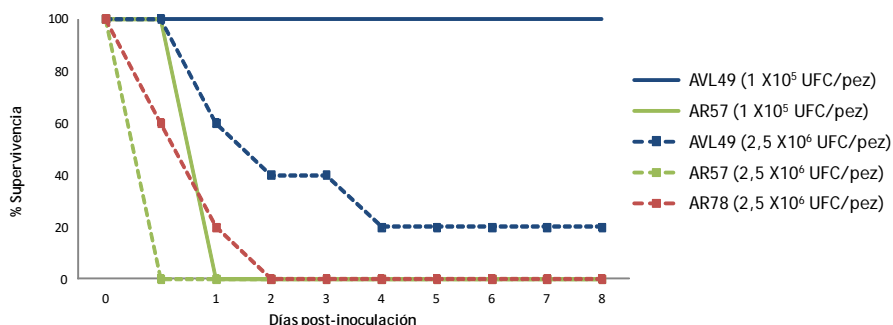


Fig. IV.1: Supervivencia (%) de lubinas tras inoculación intraperitoneal con dos dosis (1×10^5 UFC/pez y $2,5 \times 10^6$ UFC/pez) de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* AR57 portadora del plásmido virulento pPHDD1 y su derivado mutante para los genes Δdly y $\Delta hlyA_{pl}$ (AR78); y la cepa AVL49 carente de pPHDD1 (ver Tabla III.2 de Material y Métodos) (n=10 peces por cepa).

Tal y como podemos observar en la Fig. IV.1, a una dosis de 1×10^5 UFC/pez, la cepa AVL49 (\nexists pPHDD1), no causó muerte en los peces después de 8 días post-infección, mientras que la cepa AR57 (\exists pPHDD1) mató el 100% de los animales en las primeras 24 horas. Sin embargo, la inoculación de $2,5 \times 10^6$ UFC/pez de AVL49 mató al 80% de las lubinas después de 8 días, mientras que a la misma dosis, AR57 causó el deceso fulminante del 100% de los peces durante las primeras 24 horas post-inoculación (Fig. IV.1). Estas observaciones sugieren que la cepa sin plásmido AVL49 es menos virulenta que la cepa AR57, resultados acordes a los obtenidos en el estudio de Fouz *et al.* (1993), en el que las cepas RG-91, RM-71 y CDC-2227-81 portadoras de pPHDD1 (Rivas *et al.*, 2011), eran las más virulentas, y la cepa LD-07 carente del mismo (Rivas *et al.*, 2011), moderadamente virulenta.

Con el fin de determinar si las diferencias de virulencia entre la cepa AR57 (\exists pPHDD1) y la cepa AVL49 (\nexists pPHDD1) fueron causadas, al menos en parte, por *Dly* y *PhlyP*, y de si la toxina *PhlyC* de AR57 intervenía en la virulencia bajo nuestras condiciones experimentales, se realizaron ensayos de virulencia con un mutante doble $\Delta dly \Delta hlyA_{pl}$ en AR57 (AR78). Para ello, inoculamos lubinas con AR78 a una dosis de $2,5 \times 10^6$ UFC/pez. Si bien mostró un retraso temporal en el patrón de mortalidad con respecto a la cepa parental, el doble mutante causó la muerte del 100% de los peces al final del

segundo día post-inoculación, siendo más virulento que la cepa AVL49 en la misma dosis (Fig. IV.1). En contraposición a nuestros resultados, Rivas *et al.* (2013b) habían afirmado la necesidad de la presencia de pPHDD1 para una virulencia completa en ratones y rodaballo. Además, Rivas *et al.* (2013b) mostraron que la cepa AR78 no era capaz de causar la muerte en rodaballo (a una dosis de $2,1 \times 10^4$ UFC/pez para rodaballos de 15 g de peso y a una temperatura inferior a 24 °C). Esta diferencia de resultados podría deberse bien a la dosis (no observamos mortalidades a una dosis de 1×10^5 UFC/pez), o bien al hospedador y temperatura empleados. Es interesante apuntar que a estos autores ya les había llamado la atención que PhlyC, con homólogos en varias especies de *Vibrio*, algunos de ellos patógenos de peces, no fuese tóxica para el modelo de pez elegido a menos que fuese acompañada de Dly.

Estos resultados sugieren que la cepa AVL49 carente de pPHDD1 es capaz de desarrollar una enfermedad en lubinas, y que la toxina PhlyC de la cepa AR78 (\exists pPHDD1) también es tóxica para lubinas bajo nuestras condiciones de experimentación. Por otro lado, a pesar de que AR78 y AVL49 solo comparten, *a priori*, la hemolisina PhlyC, la cepa portadora de pPHDD1 presenta valores de virulencia más altos. Esta diferencia podría deberse a una mayor actividad de la hemolisina PhlyC en cepas con pPHDD1, bien porque sea más activa o bien por estar incrementada su expresión por la delección de Dly y PhlyP (pPHDD1 presenta posibles proteínas reguladoras), o por la acción de proteínas desconocidas codificadas en pPHDD1 (Rivas *et al.*, 2011).

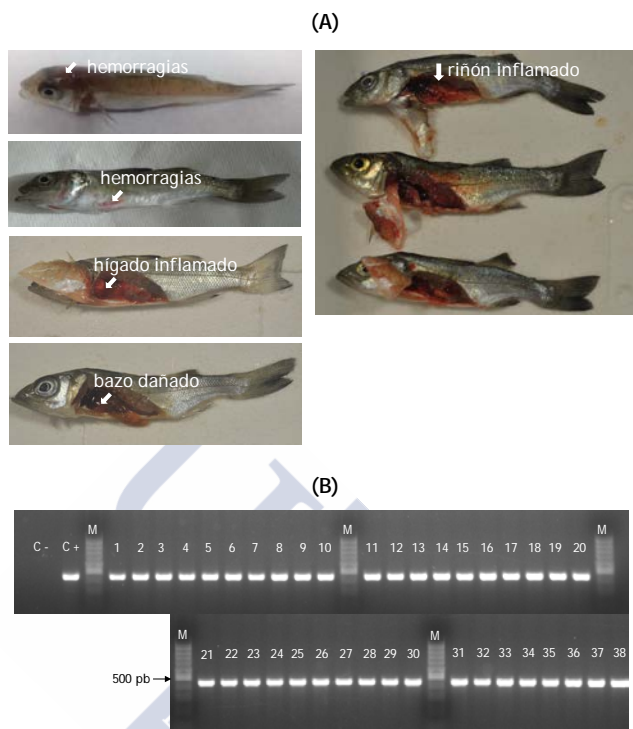


Fig. IV.2: (A) Signos externos e internos en lubinas infectadas experimentalmente con *P. damsela* subsp. *damsela* durante los ensayos de virulencia. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación del gen *ureC* en las 38 colonias de *P. damsela* subsp. *damsela* aisladas de los peces muertos durante el ensayo de virulencia. (M) Marcador de peso molecular 100 pb (O'GeneRuler); (C+) *P. damsela* subsp. *damsela* AVL49.

4.1.2. Comparación de la citotoxicidad entre las cepas LD-07 (∄ pPHDD1) y AR78 (∃ pPHDD1)

Con respecto al potencial citotóxico de *P. damsela* subsp. *damsela*, Fouz *et al.* (1993) y Labella *et al.* (2010a) ya habían demostrado la toxicidad de diversas cepas, portadoras o no de pPHDD1, en líneas celulares de peces y de mamíferos, datos que se constataron en estudios posteriores (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2014). Con el fin de contrastar las citotoxicidades de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* sin y con pPHDD1, eliminando los efectos de los factores de virulencia plasmídicos Dly y PhlyP, realizamos un ensayo de ATP (sección 3.15.3 de Material y Métodos) comparando

los efectos causados por los productos extracelulares (ECPs) de la cepa mutante AR78 ($\Delta dly \Delta hlyA_{pl}$) y de la cepa parental AVL49 ($\Delta pPHDD1$). El experimento de toxicidad se realizó empleando la línea celular AB.9 de pez cebra. Como se observa en la Fig. IV.3, los datos obtenidos mostraron que la cepa AR78 disminuyó en 10 veces el ATP celular de las células AB.9 comparado con la cepa AVL49. Es decir, el daño ocasionado por los ECPs de la cepa AR78 en las células eucariotas, ocasionó la disminución del 95% de su ATP intracelular, manteniéndose únicamente el 5% de su ATP celular. En contraposición, AVL49 provocó la reducción del 50% del ATP de las células AB.9.

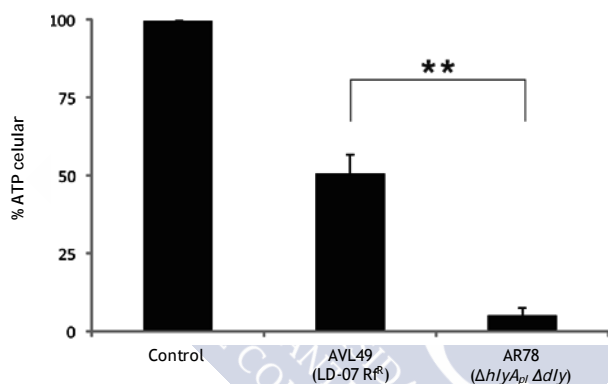


Fig. IV.3: Porcentaje de ATP celular en células eucariotas (línea celular AB.9 de pez cebra) tratadas con productos extracelulares (ECPs) de *P. damsela* subsp. *damsela*. El ATP se midió después de incubar las células AB.9 a 28 °C con ECPs de las cepas indicadas (400 µg/mL proteína total) durante 90 min. Control: medio de cultivo. Valores medios \pm SE; n=3; **, $P \leq 0.01$. La significación estadística se determinó mediante una prueba t de Student de dos colas, no apareada y paramétrica.

Corroborando el resultado obtenido en el ensayo de virulencia, la cepa carente de pPHDD1 AVL49 es citotóxica para la línea celular AB.9. Además, al igual que se observó en los datos de la virulencia, la citotoxicidad de la cepa AR78, a pesar de no producir las toxinas Dly y PhlyP, sigue siendo mayor que la de la cepa carente de plásmido. Por otro parte, estos datos sugieren que la toxicidad de *P. damsela* subsp. *damsela* se basa principalmente en factores de virulencia secretados.

4.2. BÚSQUEDA DE NUEVOS FACTORES DE VIRULENCIA: ANÁLISIS COMPARATIVO DE CUATRO GENOMAS DE *P. DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE*

Tal y como hemos concluido en el apartado anterior, la cepa de *P. damsela* subsp. *damsela* AVL49 (derivado resistente a rifampicina de la cepa salvaje LD-07) carente de pPHDD1, presenta factores de virulencia secretados, capaces de causar toxicidad en células de pez cebra. Con la finalidad de identificar algunos de los factores de virulencia secretados, y obtener una visión general de las diferencias genéticas entre las cepas portadoras y las no portadoras del plásmido pPHDD1, procedimos a la obtención de la secuencia completa de los genomas de la cepa con pPHDD1 RM-71, así como de las cepas A-162 y LD-07, carentes del mismo, y realizamos un análisis comparativo utilizando como referencia el genoma de la cepa tipo CIP 102761 (nº de acceso GenBank ADBS000000000), cepa también portadora de pPHDD1.

4.2.1. Características generales de los genomas a estudiar

La secuenciación de los genomas completos de las cepas A-162, LD-07 y RM-71 de *P. damsela* subsp. *damsela* se llevó a cabo utilizando un secuenciador Illumina MiSeq, a partir del que se obtuvieron lecturas fiables posteriormente ensambladas y anotadas empleando las herramientas bioinformáticas adecuadas (sección 3.6.1 de Material y Métodos).

La presencia de dos cromosomas es una característica de la familia *Vibrionaceae* (Thompson *et al.*, 2009), y al igual que en el resto de los miembros de esta familia, el cromosoma I (de mayor tamaño) de *Photobacterium* parece estar más conservado entre las diversas especies (Machado & Gram, 2017). En él se organizan los genes fundamentales para la supervivencia de la bacteria (Okada *et al.*, 2005). Por el contrario, el cromosoma II es más variable, de menor tamaño y alberga las principales diferencias genómicas entre las cepas de la misma especie (Machado & Gram, 2017). Por otra parte, la composición de los genes y su posicionamiento están más conservados en el cromosoma grande en comparación con el cromosoma pequeño (Reen *et al.*, 2006). Estas características son

típicas de bacterias con múltiples cromosomas (Harrison *et al.*, 2010). En nuestro caso, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, como miembro de la familia *Vibrionaceae*, también presenta una disposición genómica de dos cromosomas (más abajo, Fig. IV.6). Según Machado & Gram (2017), el cromosoma secundario junto con los plásmidos y demás elementos móviles, parecen ser la fuente de la plasticidad genética reflejada en los diferentes fenotipos observados dentro de los miembros del género *Photobacterium*, y de la familia *Vibrionaceae* en general. Del mismo modo, Balado *et al.* (2017b) también apoyarían la teoría de que los cromosomas secundarios son bancos de pruebas evolutivas sometidos a mayores tasas de cambio, al descubrir un mayor número de pseudogenes en el cromosoma II de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Debemos destacar que de los cuatro genomas analizados en el presente estudio, solamente el genoma de la cepa tipo CIP 102761 está cerrado, lo cual nos permite distinguir los dos cromosomas, en cambio, en el resto, esta distinción solo la podemos visualizar a la hora de compararlos con CIP 102761.

El genoma de *P. damsela* subsp. *damsela* CIP 102761 difiere en cuanto a tamaño y en número de genes de las otras tres cepas analizadas (Tabla IV.1). El genoma completo de esta cepa suma un total de 5.046.328 pb y un contenido medio de guanina+citosina (GC) del 40,7% (Tabla IV.1). La anotación basada en el servidor RAST (Overbeek *et al.*, 2014) identificó 4.267 secuencias codificantes predichas (CDS), 4.572 genes y 223 ARNs en el genoma de CIP 102761 (Tabla IV.1). La secuencia actualmente disponible de CIP 102761 presenta 8 *contigs* (Tabla IV.1). El cromosoma I (C-I) se presenta en un único *contig* (*contig* 58), que consta de 3.236.779 pb. Por su parte, el cromosoma II (C-II) contenido en el *contig* 57, posee 1.307.345 pb. El resto de los *contigs* pertenecen a plásmidos o a diversas secuencias no ensambladas, entre los que se ha identificado el plásmido virulento pPHDD1 (153 Kb) (Rivas *et al.*, 2011), que codifica la hemolisina PhlyP y la damsellisina (Dly) y se encuentra en aquellas cepas más virulentas (Rivas *et al.*, 2013b), y un plásmido al que hemos denominado pPHDD203 (203 Kb) que codifica un posible sistema de secreción de tipo III, pero que no hemos caracterizado a nivel funcional (Tabla IV.1).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla IV.1: Características generales de los genomas de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* analizados en este trabajo. (+/-) presencia o ausencia; entre paréntesis códigos de proteínas.

Características	Cepas			
	CIP 102761	RM-71	A-162	LD-07
Caract. del genoma:				
Tamaño del genoma (pb)	5.046.328	4.485.055	4.272.996	4.321.079
% GC	40,7	40,6	40,8	40,6
Nº de <i>contigs</i>	8	127	203	80
Nº de genes totales	4.572	4.022	3.859	3.787
Nº de CDS ^a totales	4.267	3.864	3.701	3.680
Nº de CDS ^a únicos	241	262	34	207
ARNs	223	177	154	104
Nº Subsistemas funcionales	519	507	496	495
Factores de virulencia:				
Plásmido pPHDD1	+	+	-	-
SSTIII	+	-	-	-
	(VDA_000181 a VDA_000203)			
<i>hlyA_{cr}</i>	+	+	+	+
	(VDA_002420)	(A0J47_02585)	(A9D46_00870)	(A0J46_02060)
<i>pIpV</i>	+	+	+	+
	(VDA_002242)	(A0J47_05605)	(A9D46_03080)	(A0J46_07665)
<i>colP</i>	-	-	+	+
			(A9D46_13210)	(A0J46_15580)

^aCDS: secuencias codificantes predichas

Con respecto a la secuencia del genoma de la cepa RM-71 (nº de acceso GenBank LYBT01000000) aislada de rodaballo de cultivo en España, éste consiste en dos cromosomas circulares y el plásmido pPHDD1 (Rivas *et al.*, 2011) distribuidos en un total de 127 *contigs* (Tabla IV.1). En total, el tamaño del genoma de RM-71 consta de 4.485.055 pb y un contenido medio de GC del 40,7%, de los cuales 153.429 pb (172 ORFs; 37,9% GC) constituyen el plásmido pPHDD1 (*contig* 20). La anotación basada en RAST identificó 3.864 secuencias codificantes predichas (CDS), 4.022 genes y 177 ARNs en este genoma (Tabla IV.1).

En cuanto a los genomas de las cepas carentes del plásmido pPHDD1, el genoma de la cepa LD-07 aislada de dorada de cultivo en España (nº de acceso GenBank LYBU01000000), consiste en dos cromosomas circulares distribuidos en un total de 80 *contigs* que

suman un tamaño de 4.321.079 pb y 40,6% de contenido GC. La anotación basada en RAST identificó un total de 3.680 secuencias codificantes predichas (CDS), 3.787 genes y 104 ARNs. Por su parte, el genoma de la cepa A-162 aislada de anguila en Bélgica (nº de acceso GenBank LZFN01000000), consiste en dos cromosomas circulares distribuidos en 203 *contigs* que suponen un total de 4.272.996 pb de tamaño y con un 40,8% GC. La anotación basada en RAST identificó 3.701 secuencias codificantes predichas (CDS), 3.859 genes y 154 ARNs (Tabla IV.1).

En conjunto, los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* analizados presentan un tamaño que oscila entre 4 y 5 Mb (Tabla IV.1), acorde a los tamaños de otros genomas descritos en *Photobacterium* spp. (3,9 - 6,4 Mb), y en general de la familia *Vibrionaceae* (Machado & Gram, 2017; Moi *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2009). En base a estos datos, *P. damsela* subsp. *damsela* es uno de los ejemplos del género *Photobacterium* con genoma de gran tamaño, presentando unos tamaños próximos a los de *P. angustum*, *P. kishitanii* y *P. aquae* (Machado & Gram, 2017). Algunos autores han asociado la versatilidad ambiental con una genoma de gran tamaño, como le sucede a *P. profundum* (6,4 Mb), microorganismo capaz de crecer a temperaturas bajas y ambientes presurizados. Con respecto al contenido GC, las especies del género *Photobacterium* presentan porcentajes que oscilan entre el 38,7 y el 50,9%, estando compiladas en dos grupos en base a su %GC: uno con aproximadamente el 40,5 y otro con valores próximos al 50% (Machado & Gram, 2017). *P. damsela* subsp. *damsela* se localizaría en el primero de ellos, dado que muestra valores entre 40,6%-40,8% (Tabla IV.1). El contenido de GC se ha llegado incluso a vincular con la adaptación a condiciones ambientales, así como con el uso de aminoácidos (Lightfield *et al.*, 2011). A lo largo de los últimos años, se han presentado y discutido varias teorías para la evolución de los genomas bacterianos que explicarían el pequeño tamaño de algunos de ellos, los diferentes contenidos GC, así como las reducciones y expansiones genómicas (Machado & Gram, 2017). Se ha demostrado, por ejemplo, que el contenido GC y el tamaño genómico están relacionados con las estrategias ecológicas de las diferentes bacterias marinas, presentando

valores más pequeños aquellos microorganismos de vida libre (Luo y Moran, 2015). Además, se espera que simbioses, patógenos y comensales experimenten una reducción del genoma debido a la especialización (Morris *et al.*, 2012; Giovannoni *et al.*, 2014), tal y como sucede por ejemplo, con la subsp. *piscicida* (Balado *et al.*, 2017b). Dado que en la secuenciación realizada en el presente trabajo se obtuvieron los genomas parcialmente fragmentados en *contigs*, no fue factible realizar un estudio pormenorizado de la reorganización de los genomas, ni tampoco analizar la presencia/ausencia de Islas Genómicas y de secuencias repetidas en tándem, datos que nos aportarían información acerca de la plasticidad del genoma de *P. damsela* subsp. *damsela*.

En otro orden de ideas, empleando el servidor RAST, se obtuvo una asociación de los genes de cada cepa en subsistemas funcionales agrupados en 26 categorías (Fig. IV.4). Un subsistema es un conjunto de roles funcionales que el anotador ha decidido que deben considerarse como relacionados. Es necesario mencionar que aproximadamente el 50% de las CDS de cada cepa pudieron ser agrupadas en estos subsistemas funcionales. De este modo, el servidor compiló a los genes de las cepas CIP 102761, RM-71, A-162 y LD-07 en 519, 507, 496 y 495 subsistemas, respectivamente (Tabla IV.1). En el próximo apartado estudiaremos en detalle estos datos.

Distribución de los subsistemas en categorías

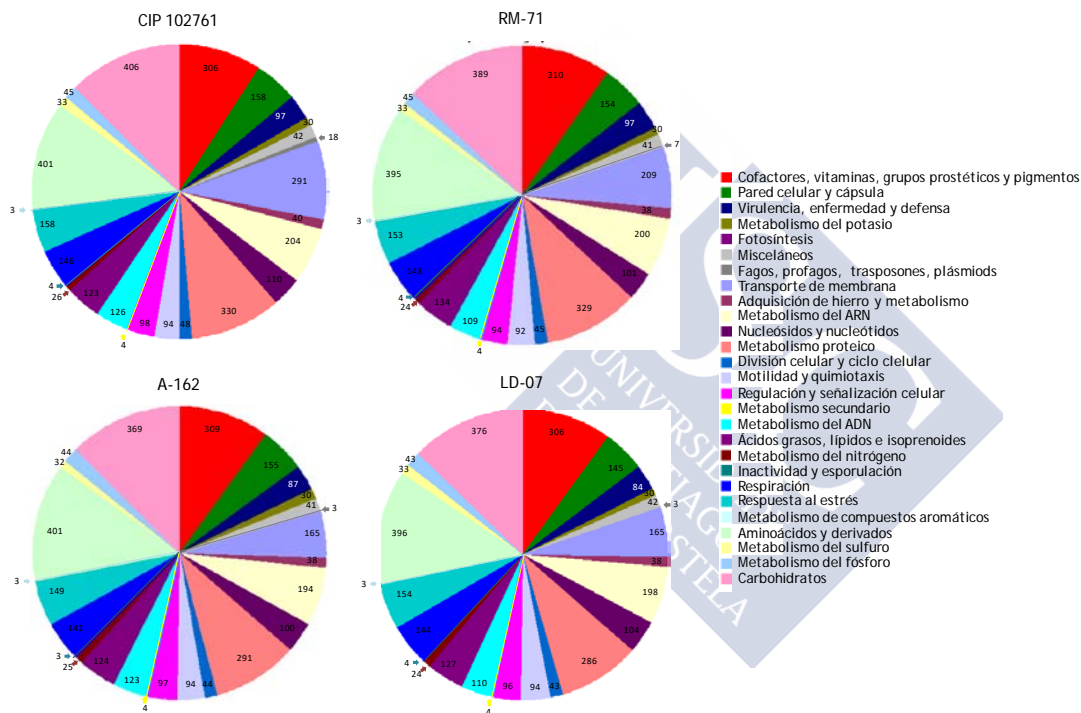


Fig. IV.4: Categorías funcionales de los genes de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* indicadas. Los genes se clasifican según su función en los subsistemas y se distribuyen en las diferentes categorías (basado en la anotación del servicio RAST). Los dígitos indican el número de genes por categoría.

4.2.2. Análisis comparativo de los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela*

La comparación genética de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* CIP 102761, RM-71, LD-07 y A-162 desarrollada mediante el servidor RAST, reveló que el núcleo común de los genomas incluye un total de 2.583 genes codificadores de proteínas y un pangenoma estimado que constituye unos 4.769 genes (Fig. IV.5). Teniendo en cuenta que el número de genes promedio de las cepas de esta bacteria es de 4.060 genes, 2.583 genes representan aproximadamente el 64% del genoma total, lo que significa que más de la mitad del genoma se conserva en todas las cepas. Desde una visión particular, nos encontramos con un número semejante de genes específicos por cepa en el caso de RM-71 (262 genes únicos), CIP 102761 (241 genes únicos) y LD-07 (207 genes únicos), siendo este número más reducido en el caso de la cepa A-162, que tan solo presenta 34 genes específicos, lo cual también podría ser consecuencia de su menor tamaño en pb (Tabla IV.1; Fig. IV.5). En base a uno de los objetivos planteados en el presente trabajo, destacamos la presencia de 10 ORF compartidas únicamente por las dos cepas sin plásmido A-162 y LD-07 (Fig. IV.5). En la sección 4.2.3 llevaremos a la práctica un estudio pormenorizado de estos genes.

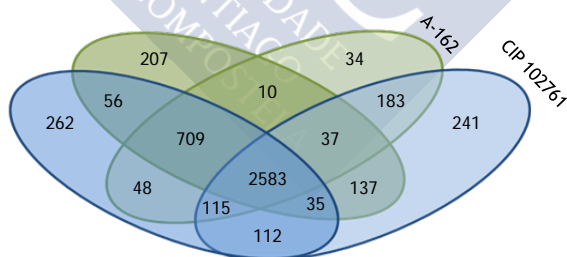


Fig. IV.5: Diagrama de Venn de proteínas específicas y ortólogos en cada uno de los cuatro genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* analizados. Las cepas sin plásmido (LD-07 y A-162) se muestran en verde, y las portadoras de pPHDD1 (CIP 102761 y RM-71) en azul. Los posibles genes ortólogos fueron definidos como proteínas "reciprocal best-hit" con un mínimo de 90% de identidad.

En general, el ensamblaje de los tres nuevos genomas secuenciados mostró un alto grado de sintenia en los cromosomas I y II (Fig. IV.6). Se confirmó que 5 *scaffolds* de la cepa tipo CIP 102761

contenían genes relacionados con plásmidos (por lo tanto constituyen plásmidos candidatos), tal y como ya se ha comentado en el apartado anterior (Fig. IV.6). Además, se demostró que dos regiones de genes que codifican posibles profagos (una en el cromosoma I y otra en el cromosoma II) son específicas para la cepa tipo CIP 102761 (Fig. IV.6), dato esperado en base a los resultados observados en la distribución funcional de los genes (Fig. IV.7). Estas observaciones contribuirían a explicar el mayor tamaño del genoma de esta cepa (Tabla IV.1).

Aunque algunas secuencias de las cepas RM-71, LD-07 y A-162 mostraron cierta similitud con regiones únicas de la cepa tipo CIP 102761, esto se debió principalmente a la presencia de elementos de inserción, genes de integrasas de fagos, de proteínas de partición de plásmidos y de proteínas de formación de la maquinaria de conjugación (entre 80 y 40% de identidad). Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, uno de los plásmidos específicos de CIP 102761 (denominado aquí pPHDD203) corresponde a un *scaffold* de 203 kb (GenBank, ADBS01000003), que codifica un posible sistema de secreción de tipo III (SSTIII) que está ausente en los otros tres genomas (Tabla IV.1). Aunque el SSTIII es un posible factor de virulencia, lo descartamos en nuestro estudio, ya que está ausente en la cepa RM-1, portadora del pPHDD1, así como en las dos cepas sin plásmido. Las cepas RM-71 y CIP 102761 comparten 112 genes, que incluyen la mayoría de los genes del plásmido pPHDD1, y están ausentes en las dos cepas LD-07 y A-162, carentes de dicho plásmido como ya se ha indicado con anterioridad (Fig. IV.5). Esto sugiere que la menor virulencia que muestra LD-07 en comparación con RM-71 (Fig. IV.1), puede basarse en la existencia de factores de virulencia adicionales específicos de pPHDD1. En este sentido, la reciente evidencia de que pPHDD1 contiene un gen relacionado con la virulencia homólogo a *vep20* de *Vibrio vulnificus*, que codifica un receptor de transferrina (Pajuelo *et al.*, 2015), sugiere que nuestro conocimiento acerca de los genes de virulencia presentes en pPHDD1 puede ser incompleto, y podría ir más allá de los genes de las hemolisinas ya descritas. Además, es posible que la acumulación de mutaciones puntuales dentro de la secuencia del gen *hlyA_{cr}* constituya

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

una explicación adicional de las diferencias de virulencia entre AVL49 y AR78 ($\Delta dly \Delta hlyA_{pi}$) (Fig. IV.1). En este sentido, un estudio reciente ha demostrado que determinadas mutaciones puntuales en *hlyA_{cr}* afectan a la actividad hemolítica (Rivas *et al.*, 2014). En base a estas observaciones, decidimos que el gen *hlyA_{cr}* (que codifica la hemolisina PhlyC) también será objeto de estudio en esta investigación acerca de la virulencia de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1 (Capítulo 4.3 de Resultados y Discusión).

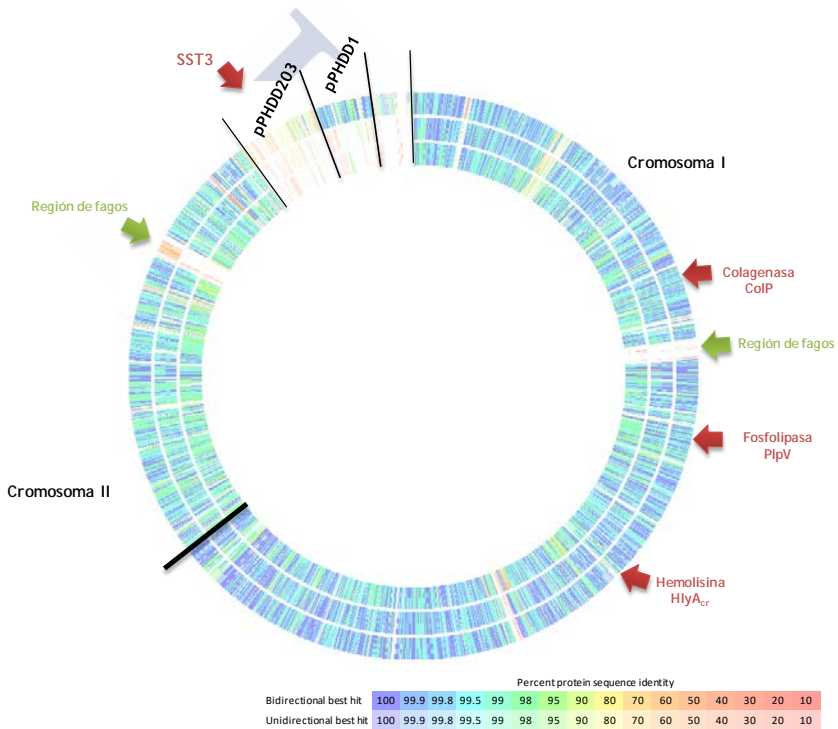


Fig IV.6: Comparación de genomas de *P. damsela* subsp. *damsela*. Del anillo exterior al anillo interior: RM-71, A-162 y LD-07. El genoma de la cepa tipo CIP 102761 fue utilizado como referencia y no se muestra porque estaría representado como un círculo continuo. Las líneas negras han sido dibujadas para separar los cromosomas y los plásmidos. Téngase en cuenta que el genoma de CIP 102761 incluye un posible plásmido de gran tamaño (pPHDD203), varios plásmido de pequeño tamaño, y dos regiones de fagos, regiones todas ellas ausentes en las otras tres cepas.

Con la finalidad de obtener una visión general de las cuatro cepas estudiadas, realizamos una comparación de las distribuciones de sus genes según sus funciones (Fig. IV.7). Este análisis *in silico* reveló algunas diferencias en las categorías de fagos y profagos, transporte de membrana, metabolismo proteico, metabolismo de ADN, carbohidratos, virulencia, enfermedad y defensa.

La primera categoría funcional en la que percibimos desigualdad entre las cepas, es la de fagos, profagos, transposones y plásmidos (Fig. IV.7). El intercambio genético de ADN foráneo por medio de elementos transponibles, infección por fagos o plásmidos conjugativos, ha sido sugerido como una fuerza impulsora en la evolución de los miembros de la familia *Vibrionaceae* (Machado & Gram, 2017). Como podemos contemplar en la Fig. IV.7B, el número de genes relacionados con la presencia de fagos/profagos es mayor en la cepa CIP 102761, siendo el doble de genes que los existentes en RM-71 y el séxtuplo que en A-162 y LD-07. Una posible explicación podría ser la presencia de plásmido(s) en las cepas CIP 102761 y RM-71 y la ausencia de los mismos en las cepas LD-07 y A-162. Confirmando estos datos, el servidor PHAST (*PHAge Search Tool*) (Zhou *et al.*, 2011) identificó en CIP 102768 un profago intacto constituido por 18 genes que suponen un total de 24.703 pb con 42,2%GC. Si bien es cierto que en el presente trabajo no se analizó la presencia de elementos de inserción (IS), Balado *et al.* (2017b) han demostrado la presencia en CIP 102761 de un total de 45 IS pertenecientes a 7 familias distintas (15 en C-I, 5 en C-II y el resto extracromosómicas) y 6 transposones (1 en C-I, 2 en C-II y 3 extracromosómicos). Este número de elementos móviles difiere considerablemente de los valores encontrados en la subsp. *piscicida*, 344 elementos de inserción en el cromosoma I y 255 en el cromosoma secundario, además de un total de 12 transposones, como media (Balado *et al.*, 2017b). Estos datos podrían explicar la reorganización cromosómica y el mayor número de pseudogenes observados en la subsp. *piscicida* en relación con la subsp. *damselae* y que se traduce entre otras, en la existencia de las diferencias fenotípicas observadas entre ambas subespecies (Balado *et al.*, 2017b; Tabla I.3 de Introducción).

Con respecto a la diferencia más evidente observada en la comparación funcional de los genes, destaca la categoría de transporte de membrana (Fig. IV.7A). Las principales disparidades residen en el subsistema de genes relacionados con la transferencia por conjugación, entre los que destacan el sistema de conjugación IncF. La cepa CIP 102761 posee 112 genes en contraposición con los 32 de RM-71 y la ausencia de los mismos en las cepas A-162 y LD-07 (Fig. IV.7B). Como ya se explicó en el comienzo de este capítulo, la cepa CIP 102761 posee más de un plásmido en su genoma (pPHDD1, pPHDD203, entre otros posibles), mientras que en RM-71 solo se ha detectado el plásmido pPHDD1. Estos genes están ausentes en las cepas A-162 y LD-07, en las que no se han detectado plásmidos conjugativos.

En lo relativo a las diferencias observadas en la categoría del metabolismo proteico, vemos desigualdades entre cepas portadoras de pPHDD1 y cepas carentes del mismo. Estos genes diferenciales, siendo el número mayor en las cepas con plásmido, están relacionados con la biosíntesis proteica y concretamente con el número de ARNt (Fig. IV.7B). Recordemos que los ARNt son considerados como puntos calientes para la inserción de material genético exógeno o reordenamiento genético. De ese modo, los genes de ARNt son generalmente empleados por las integrasas específicas de sitio (de fagos e islas genómicas) para la integración de islas genómicas en el genoma del hospedador (Hou, 1999). Existen diversas hipótesis respecto a por qué los genes del ARNt constituyen zonas de integración, como son su presencia en copias múltiples o la estructura conservada de los genes ARNt, la cual ofrece más facilidades para la inserción de las islas y fagos (Schmidt & Hensel, 2004).

Otras diferencias halladas, están en las categorías del metabolismo de ADN y carbohidratos. En lo relativo al metabolismo de ADN, detectamos genes relacionados concretamente con los subsistemas de sistemas de restricción-modificación (Fig. IV.7A). Las bacterias han desarrollado sistemas de restricción-modificación para distinguir ADN propio y foráneo. Estos sistemas son omnipresentes, y se consideran sistemas inmunes primitivos en las bacterias. Su

diversidad y prevalencia en todo el reino procariota son un indicativo de su éxito como mecanismo de defensa contra la invasión de genomas. Los sistemas de restricción-modificación comprenden dos actividades enzimáticas: una endonucleasa que reconoce y escinde secuencias de ADN extrañas en sitios específicos, y una metiltransferasa que asegura la discriminación entre ADN propio y ajeno, transfiriendo grupos metilo a la misma secuencia de ADN específica dentro del genoma del hospedador. Nuevas hipótesis indican su implicación en diversos procesos celulares, tales como la recombinación, la nutrición, la generación de diversidad genética, la virulencia, etc (Vasua & Nagaraja, 2013). Además de salvaguardar la integridad genómica, parece que en muchos organismos pueden regular el flujo genómico, estabilizar islas genómicas e incluso participar en el control de la tasa evolutiva del hospedador (Vasua & Nagaraja, 2013). Como podemos observar en la Fig. IV.7B, CIP 102761 y A-162 poseen el doble de genes relacionados con sistemas de restricción-modificación que las otras dos cepas.

Con respecto a las disimilitudes observadas en la categoría del metabolismo de carbohidratos (Fig. IV.7A), concretamente en la subcategoría de monosacáridos y más en detalle en la utilización de D-ribosa y catabolismo de desoxirribosas y desoxinucleósidos, la cepa CIP 102761 muestra un mayor número de genes (Fig. IV.7B). Así por ejemplo, se ha llegado a relacionar el catabolismo de desoxirribosas con la colonización del intestino de murinos por cepas patógenas de *E. coli* (Martinez-Jéhanne *et al.*, 2009), y la capacidad por parte de especies patógenas de *Vibrio* de degradar el mucus gastrointestinal de mamíferos y emplear sus constituyentes como fuente de carbono (contiene ribosa entre otros azúcares) (Boyd *et al.*, 2015).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

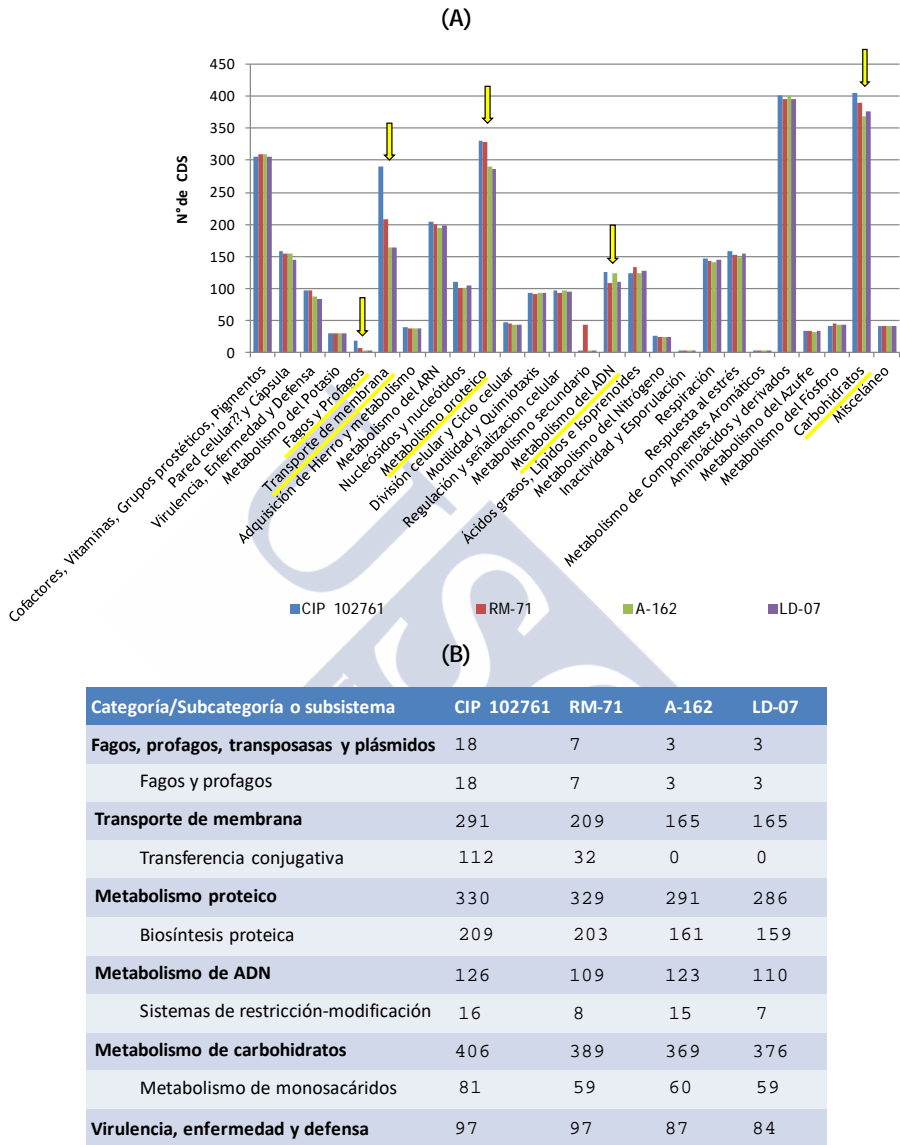


Fig. IV.7: (A) Distribución de las secuencias codificantes predichas (CDS) en 26 categorías funcionales de genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* (CIP 102761, RM-71, A-162 y LD-07) basadas en la agrupación realizada por el servidor RAST. (B) Diferencias en el número de genes de las categorías funcionales indicadas, en los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* CIP 102761, RM-71, A-162 y LD-07.

Dada la importancia para nuestro estudio de la categoría de virulencia, enfermedad y defensa, decidimos indagar en sus genes (Fig. IV.7). Así, dentro de esta categoría, hallamos los denominados factores de colonización accesorios (ACF), descritos en *V. cholerae* como necesarios para la colonización intestinal en ratón (Peterson & Mekalanos, 1988). También se han localizado genes de tolerancia a la colicina E2, una endopeptidasa de DNA (Schaller & Nomura, 1976) de Gram negativas con actividad bacteriocida (Cascales *et al.*, 2007), así como un operón de producción de colicina V y bacteriocinas. Destaca la presencia de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos, lo que concuerda con la resistencia que muestran los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* a Ampicilina y Penicilina (Fouz *et al.*, 1992; Yamane *et al.*, 2004); y de resistencia a tetraciclina, que guardan congruencia con los datos aportados por Labella *et al.* (2006) pero no con los de Fouz *et al.* (1992), que muestra aislados sensibles a este antibiótico. Además, se han encontrado genes relacionados con la hidrólisis de ácidos biliares, dato que se refleja en la capacidad de *P. damsela* subsp. *damsela* de crecer en medio TCBS (Fouz *et al.*, 1992); inhibidores de lisozima (no presentes en LD-07) que permiten la evasión de ese elemento del sistema inmune innato, como es en el caso de la relación entre *Edwardsiella tarda* y rodaballo (Li *et al.*, 2015); y genes relacionados con la invasión y resistencia intracelular, así como con la homeostasis de cobre, la resistencia al arsénico y a compuestos cromados, y bombas de flujo de resistencia a múltiples drogas. Destacamos que el número de los genes catalogados es mayor en las cepas portadoras de pPHDD1, y que éstos suelen estar relacionados con la resistencia a antibióticos y componentes tóxicos. A pesar de ello, en esta agrupación funcional no se incluyen los factores de virulencia descritos en cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* portadoras de pPHDD1 (Dly, PhlyP y PhlyC).

Por último, la búsqueda de operones de biosíntesis del metabolismo secundario mediante el servidor antiSMASH 3.0 (Weber *et al.*, 2015), reveló la presencia en los cuatro genomas de un operón de síntesis de tiopéptidos (Fig. IV.8). Los tiopéptidos son una clase de péptidos ricos en azufre sintetizados por bacterias, con carácter

antibacteriano debido a la inhibición de la síntesis de proteínas ribosómicas (Just-Baringo *et al.*, 2014). Su impresionante perfil *in vitro* contra bacterias Gram-positivas y sus nuevos mecanismos de acción, han llamado la atención de muchos grupos, tanto en la academia como en la industria, ya que representan una alternativa a otros antibióticos que actualmente se enfrentan a la resistencia por patógenos clásicos (Just-Baringo *et al.*, 2014). A pesar de ello, hasta la fecha, solo dos tiopéptidos han llegado al mercado y son de uso exclusivo en veterinaria. La falta de formulaciones de tiopéptidos para uso humano se debe a su baja solubilidad acuosa, una limitación que también restringe su uso en animales (Just-Baringo *et al.*, 2014).

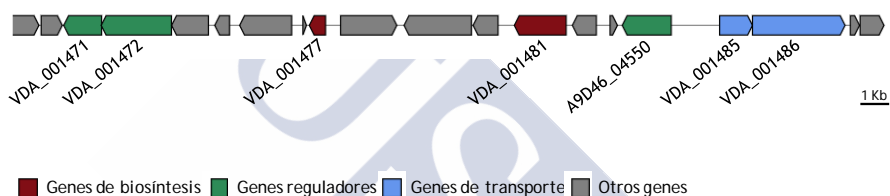


Fig. IV.8: Operón de síntesis de tiopéptidos en la cepa tipo CIP 102761 de *P. damsela* subsp. *damsela*, localizado por el servidor bioinformático antiSMASH 3.0.

Al realizar el cotejo de genes entre las cepas con y sin pPHDD1, esperábamos hallar alguna diferencia más evidente entre estos dos tipos de genomas. Sin embargo, el análisis de los cuatro genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* reveló un alto grado de homogeneidad genómica entre cepas. Esta observación está en concordancia con la alta homogeneidad bioquímica mostrada por todas las cepas, independientemente de su origen geográfico y fuente de aislamiento. Es importante señalar que estos resultados tampoco nos han extrañado demasiado dado que el servidor RAST solo fue capaz de agrupar funcionalmente el 50% de las CDS de cada cepa, relegando un gran número de ellas fuera de esta comparación de funciones. Nuestro siguiente paso a seguir, y del que esperábamos conseguir resultados más reveladores, consistió en analizar en profundidad las 10 ORFs halladas únicamente en las cepas A-162 y LD-07 (≠ pPHDD1) (Fig. IV.5; Tabla IV.2).

4.2.3. Estudio *in silico* de las ORFs específicas de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes del plásmido virulento pPHDD1

Dado que la finalidad de esta parte de nuestro estudio era identificar posibles factores de virulencia presentes solo en las cepas A-162 y LD-07 (Δ pPHDD1), decidimos centrarnos en las 10 ORFs compartidas por ambas cepas, y ausentes en las portadoras de pPHDD1. Con el objetivo de buscar homologías con otras especies bacterianas y conocer sus entornos genéticos y posibles dominios proteicos, se procedió a un análisis *in silico* más pormenorizado de cada una de estas proteínas.

Tabla IV.2: Lista de genes específicos para las cepas LD-07 y A-162 (carentes de pPHDD1), ausentes en las cepas portadoras del plásmido virulento. (ident.) identidad; (aa) aminoácidos.

	Número de acceso A-162	Número de acceso LD-07	Tamaño aa	% ident.	Función
1.	A9D46_13210	A0J46_15580	801	99,12	Colagenasa microbiana, secretada
2.	A9D46_08245	A0J46_04865	388	99,22	Proteína de unión a ATP
3.	A9D46_15015	A0J46_16675	220	99,09	Proteína de función desconocida
4.	A9D46_15030	A0J46_16690	301	100	Proteína de función desconocida
5.	A9D46_03250	A0J46_07825	95	97,87	Proteína J inducible por daño de ADN
6.	A9D46_03255	A0J46_07830	110	99	Proteína de función desconocida
7.	A9D46_09235	A0J46_12460	56	96,36	toxina ParE
8.	A9D46_09230	A0J46_12465	81	97,5	ParD (antitoxina para ParE)
9.	A9D46_04550	A0J46_11030	136	99,26	Proteína de función desconocida
10.	A9D46_04555	A0J46_11035	611	99	Proteína de función desconocida

4.2.3.1. ORFs A9D46_13210/A0J46_15580: colagenasas microbianas

Las ORFs A0J46_15580 y A9D46_13210 presentes en las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* sin plásmido LD-07 y A-162, respectivamente, presentan una homología entre ellas del 99,12% de

identidad de aminoácidos y 100% de cobertura de aminoácidos (Tabla IV.2). Ambas poseen el dominio M9 (Pfam01752) característico de las peptidasas de la familia M9 (Finn *et al.*, 2016). Este tipo de enzimas están anotadas como colagenasas microbianas secretadas (EC 3.4.24.3) según la base de datos de peptidasas MEROPS (Rawlings *et al.*, 2016). Además, existen enzimas homólogas distribuidas en especies de los géneros *Photobacterium* y *Vibrio* (BLASTP), identificadas como peptidasas de la familia M9 o colagenasas, y presentes en especies consideradas como bacterias hidrolizantes de gelatina (Tabla IV.3).

Tabla IV.3: Proteínas homólogas a las ORFs A9D46_13210 y A0J46_15580 anotadas como colagenasa microbiana según BLASTP. (ident.) identidad; (cob.) cobertura.

Proteína homóloga	Especie	% ident.	% cob.	Función	Actividad gelatinasa
ABT57_16250	<i>Photobacterium ganghwense</i>	47	99	Peptidasa M9	Park <i>et al.</i> (2006)
AB733_15480	<i>P. swingsii</i>	46	99	Posible proteína	Gomez-Gil <i>et al.</i> (2011)
EA58_13585	<i>P. galathea</i>	46	99	Peptidasa M9	Machado <i>et al.</i> (2015)
A3K86_14730	<i>P. jeanii</i>	45	99	Posible proteína	Chimetto <i>et al.</i> (2010)
ASV53_19670	<i>P. sanguinancrri</i>	45	99	Colagenasa	Gomez-Gil <i>et al.</i> (2016)
A6E04_07790	<i>Aliivibrio logei</i>	47	94	Peptidasa M9	
FORC36_4508	<i>Vibrio vulnificus</i>	45	99	Colagenasa microbiada secretada	Smith & Merkel (1982)
VM_06690	<i>V. mimicus</i>	45	98	Peptidasa M9	Davis <i>et al.</i> (1981)
DN31_3237	<i>V. cholerae</i>	45	98	Colagenasa microbiana	Hoa <i>et al.</i> (2000)
CEQ50_15590	<i>V. anguillarum</i>	44	97	Colagenasa	Pazos <i>et al.</i> (1993)
AKG93_19810	<i>V. harveyi</i>	44	98	Peptidasa M9	Rico <i>et al.</i> (2008)
A1QS_00675	<i>V. ordalii</i>	44	97	Peptidasa M9	Schiewe <i>et al.</i> (1981)

Con respecto al contorno genético de estas ORFs en las cepas A-162 y LD-07, al realizar la comparación de genomas entre cepas con y sin plásmido, hallamos que ambas ocupan la misma posición en el genoma (Fig. IV.9), estando colindadas por una NADH deshidrogenasa (número 7 de la Fig. IV.9) y una ARNt sintasa (número 8 de la Fig. IV.9). Vemos claramente la ausencia del gen de esta proteína en las cepas CIP 102761 y RM-71 portadoras de pPHDD1 (Fig. IV.9). Se desconoce el mecanismo genético que haya permitido la incorporación o pérdida de esta posible colagenasa. En

base a estos datos, cabría esperar que las ORF A9D46_13210 y A0J46_15580 codificasen una enzima con capacidad de hidrolizar gelatina, rasgo presente en algunos aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* (Fujioka *et al.*, 1988; Pedersen *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2009; Labella *et al.*, 2010a; Khouadja *et al.*, 2014). Por otro lado, dado que esta proteína está presente únicamente en las cepas sin plásmido, la consideramos de interés para nuestro estudio. Decidimos denominarla ColP (Colagenasa de Photobacterium).

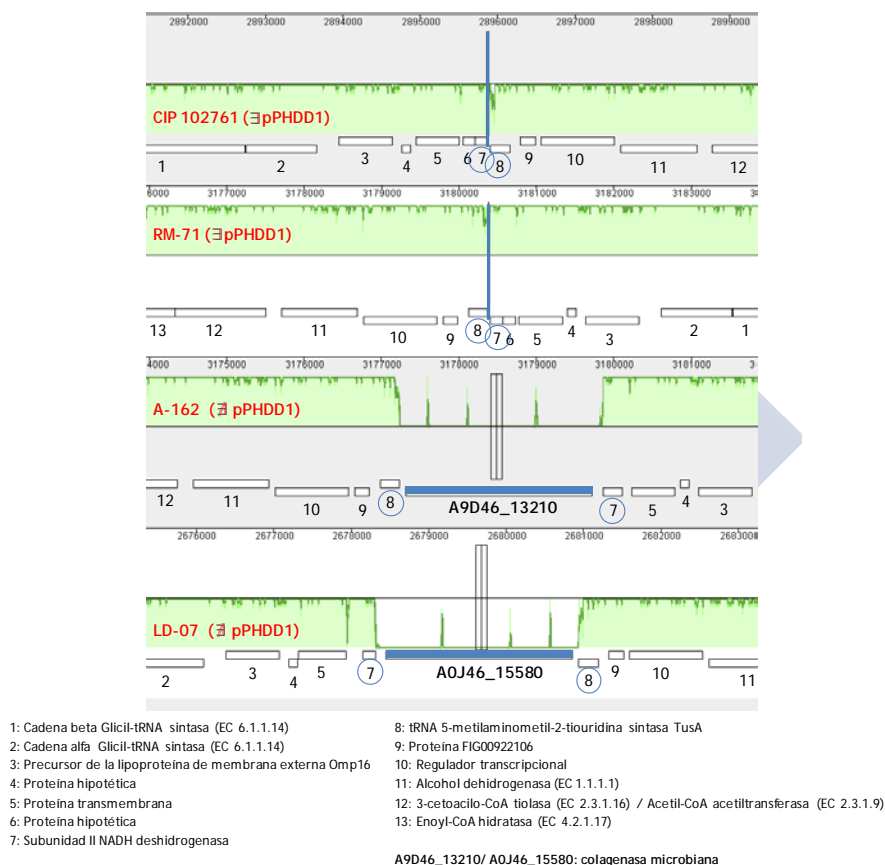


Fig. IV.9: Alineamiento de los genomas indicados de *P. damsela* subsp. *damsela* mediante el programa MAUVE (Darling *et al.*, 2010). Se muestran la localización y contexto genético de las ORFs A9D46_13210 y A0J46_15580 descritas como colagenasas microbianas, presentes en las cepas sin plásmido A-162 y LD-07, respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.3.2. ORFs A9D46_08245/A0J46_04865: Proteínas de unión a ATP (*ATP-binding protein*)

Con respecto a las ORFs A9D46_08245 y A0J46_04865, ambas han sido anotadas como proteínas de unión a ATP, es decir, que interactúan selectiva y no covalentemente con ATP (Overbeek *et al.*, 2014). Presentan entre ellas un 99,22% de identidad y 100% de cobertura (Tabla IV.2). El análisis en profundidad, ha mostrado la presencia de un dominio denominado “*dominio AAA, posible toxina AbiEii, sistema AT de tipo IV*” según Pfam (Pfam13304). Las proteínas con este dominio son consideradas por el servidor RAST como miembros del sistema de resistencia a fagos y, más concretamente, a la toxina de tipo IV-antitoxina.

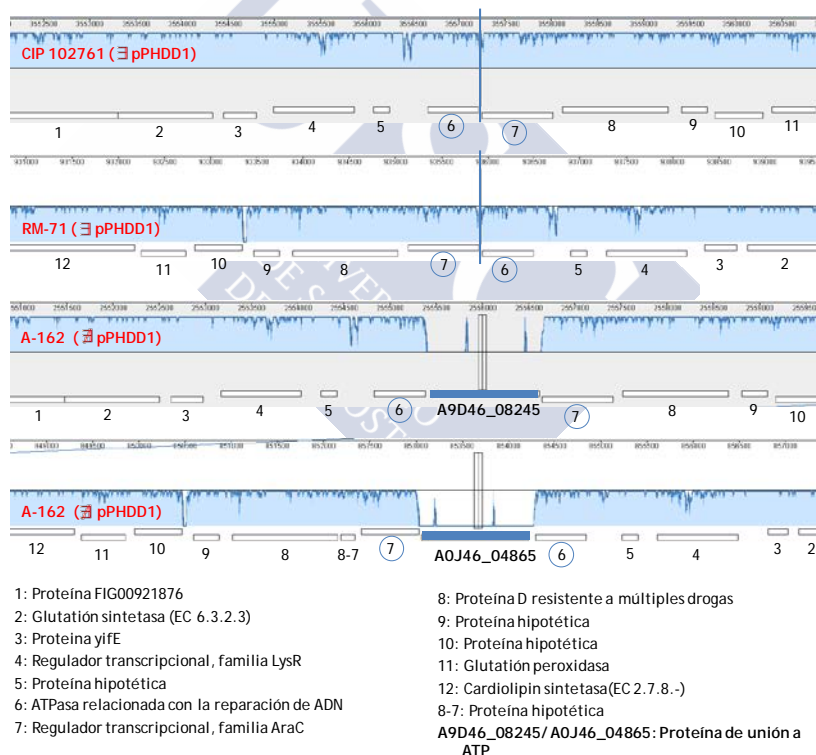


Fig. IV.10: Alineamiento de los genomas indicados de *P. damsela* subsp. *damsela* mediante el programa MAUVE. Se muestran la localización y contexto genético de los genes de las proteínas de unión a ATP A9D46_08245 y A0J46_04865 presentes en las cepas sin plásmido A-162 y LD-07, respectivamente.

Asimismo, exhiben homología con proteínas de unión a ATP de *Vibrio coralliilyticus* (88% identidad, 100% cobertura), *Photobacterium profundum* (72% identidad, 99% cobertura), y un amplio rango de especies del género *Enterovibrio* (*E. calviensis*, *E. norvegicus*, *E. corali*), y del género *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. moraviensis*, *P. syringae*), con identidades que rondan el 70% y coberturas del 99%. Ambas ORFs muestran el mismo contexto genético, estando ubicadas en las cepas sin plásmido entre los genes de una ATPasa relacionada con la reparación de ADN (n° 6 de la Fig. IV.10), y de un regulador transcripcional de la familia Arac (n° 7 de la Fig. IV.10). Estos genes adyacentes están presentes también en CIP 102761 y RM-71 (\exists pPHDD1).

4.2.3.3. ORFs A9D46_15015/A0J46_16675 y A9D46_15030/A0J46_16690: proteínas de función desconocida

Las ORFs A9D46_15015 y A0J46_16675 de las cepas A-162 y LD-07, muestran una similitud del 99,09% (Tabla IV.2). La búsqueda *in silico* de proteínas semejantes ha dado como único resultado una proteína de función desconocida (AKJ31_14985) presente en un aislado de *Vibrio hepatarius* en *Litopenaeus vannamei* de las Islas Salomon (31% identidad en aminoácidos, 86% cobertura) (Machado *et al.*, 2015). Se realizó a continuación una búsqueda pormenorizada de posibles dominios proteicos en diversas bases de datos (Pfam, Uniprot, NCBI), obteniendo resultados negativos por lo que no tenemos ningún indicio sobre su posible función. Curiosamente, de modo adyacente a estas ORFs descritas, localizamos las proteínas A9D46_15030 y A0J46_16690 (100% identidad) en las cepas A-162 y LD-07, respectivamente. En esta ocasión, hallamos un mayor número de proteínas homólogas en *Vibrio vulnificus* (62% identidad, 100% cobertura), *Vibrio cholerae* (41%, 98%) y *Photobacterium phosphoreum* (37%, 95%), pero sin dominios conocidos hasta el momento.

Estas proteínas analizadas se codifican en el mismo entorno genético en las cepas A-162 y LD-07 (Fig. IV.11). Con respecto a su

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

posición en relación con las cepas CIP 102761 y RM-71 (\exists pPHDD1), vemos que las ORFs A9D46_15015/A0J46_16675 y A9D46_15030/A0J46_16690 se ubican entre los genes de una proteína de función desconocida (n° 7 de la Fig. IV.11) y de una tiol peroxidasa (n° 9 de la Fig. IV.11).

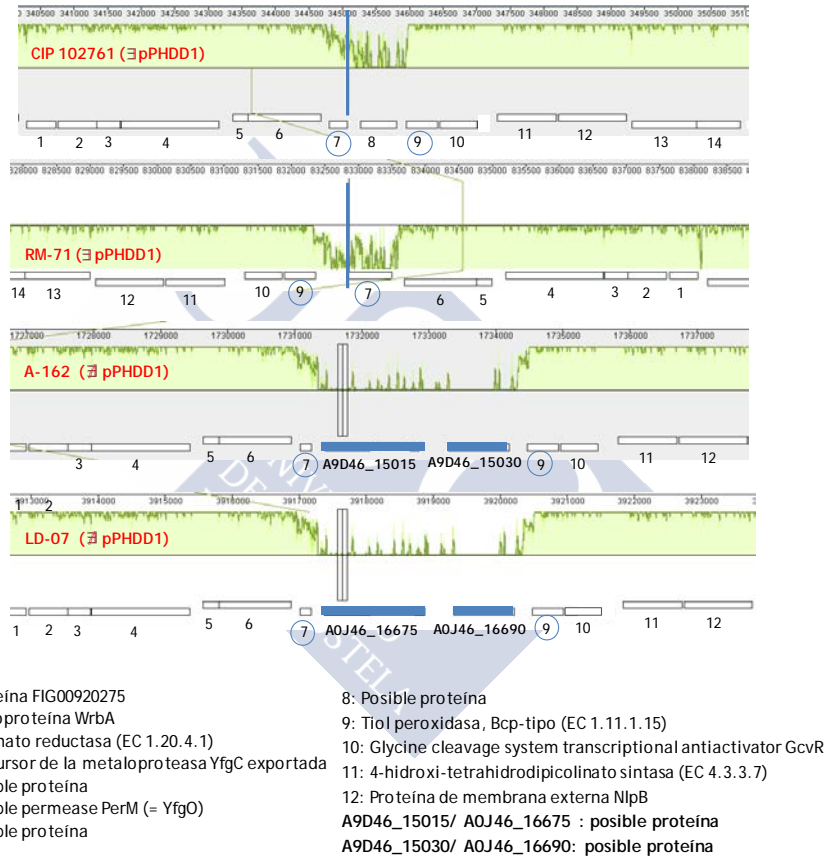


Fig IV.11: Alineamiento de los genomas indicados de *P. damsela* subsp. *damsela* mediante el programa MAUVE. Se muestran la localización y contexto genético de las ORFs A9D46_15015, A0J46_16675 y A9D46_15030 y A0J46_16690, presentes en las cepas A-162 y LD-07 (\exists pPHDD1), respectivamente.

4.2.3.4. ORFs A9D46_03250/A0J46_07825 (Proteínas J inducibles por daño al ADN) y proteínas de función desconocida A9D46_03255/A0J46_07830

Las ORF A9D46_03250 y A0J46_07825 anotadas como proteínas J inducibles por daño de ADN y con un 97,87% de similitud entre ambas (Tabla IV.2), muestran en BLASTP homología con un gran número de especies del género *Vibrio*: *V. parahaemolyticus* (90% identidad, 97% cobertura), *V. vulnificus* (89%, 97%), *V. alginolyticus* (88%, 97%), o *V. cholerae* (85%, 98%) entre muchas otras. Todos los homólogos están identificados como “proteínas J inducibles por daño al ADN”. El estudio pormenorizado de los dominios proteicos ha revelado la presencia del dominio antitoxina RelB. A este tipo de proteínas también se les denomina proteínas J inducibles por daño al ADN (Pfam: PF04221, InterPro: IPR007337). Los plásmidos pueden mantenerse estables en poblaciones bacterianas mediante la acción de módulos de adicción, en los que una toxina y una antitoxina están codificadas en un *cassette* del plásmido. En cualquier célula hija que carezca del plásmido, la toxina persiste y es letal después de que la proteína antitoxina se agota. Los pares de toxina/antitoxina también se encuentran en los cromosomas, como parece ser nuestro caso. De este modo, RelE y RelB forman un sistema de toxina-antitoxina.

En lo relativo a las ORFs A9D46_03255 y A0J46_07830 (99% de similitud entre ambas), adyacentes a las proteínas J de unión a ADN, poseen un dominio de la familia DUF4377 (Pfam14302). En esta familia se engloban muchas proteínas de función desconocida. Además, muestran homología con proteínas con dominio DUF4377 de diversas especies del género *Vibrio* (*V. owensii* 51% identidad, 90% cobertura; *V. campbellii* 46%, 94%; *V. harveyi* 48%, 81%) y de otros géneros (*Ferrimonas senticii* 55%, 80%; *Aliivibrio wodanis* 54%, 75%; *Gallaecimonas xiamenensis* 54%, 74%). Desconocemos la posible función de esta proteína.

En cuanto a su localización en el genoma, estas ORFs presentan igual contexto genético en las cepas A-162 y LD-07, estando flanqueadas, junto con el gen de la proteína J de unión a ADN citada, por los genes de una acetiltransferasa (nº 3 de la Fig. IV.12) y de una hidrogenasa (nº 4 de la Fig. IV.12), también presentes en las cepas con

plásmido (Fig. IV.12). Cabríamos esperar que A9D46_03255 y A0J46_07830 formasen parte del sistema toxina-antitoxina RelBD, ya que se localizan de modo adyacente a RelB, pero no tenemos evidencias experimentales de ello.

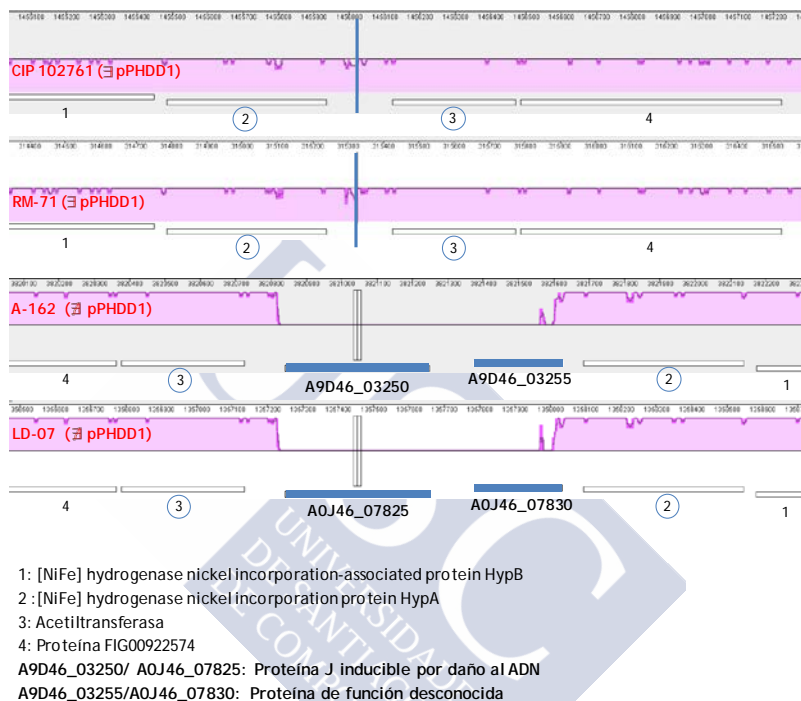


Fig. IV.12: Alineamiento de los genomas indicados de *P. damsela* subsp. *damsela* mediante el programa MAUVE. Se muestran la localización y contexto genético de las ORFs A9D46_03250, A0J46_07825 y A9D46_03255 y A0J46_07830, presentes en las cepas sin plásmido A-162 y LD-07, respectivamente.

4.2.3.5. ORFs A9D46_09235/A0J46_12460 y A9D46_09230/A0J46_12465: sistema toxina antitoxina ParED

Las ORFs A9D46_09235 y A0J46_12460, con un 96,36% de similitud (Tabla IV.2), corresponden a una proteína destinada a la estabilización de plásmidos. El estudio de posibles dominios ha revelado la presencia del dominio “toxina *ParE* o tipo II del sistema toxina-antitoxina *parDE*” (Pfam: PF05016, InterPro: IPR007712). Por

su parte, el servidor RAST anotó estas ORF como toxinas ParE. ParE forma parte del sistema toxina-antitoxina ParED que permite el mantenimiento de plásmidos en las poblaciones, al igual que el sistema toxina-antitoxina RelEB. ParE es tóxica para la ADN girasa pero es neutralizada por la antitoxina ParD. BLASTP mostró homólogos de proteínas estabilizadoras de plásmidos con alto porcentaje de identidad aminoacídica (entre el 70 y el 80%) y gran cobertura de aminoácidos (>98 %) en un gran número de especies del género *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. tubiashii*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*) y del género *Shewanella* (73% identidad, 100% cobertura).

Las ORFs A9D46_09230 y A0J46_12465 (97,5% de identidad), adyacentes genéticamente a ParE, poseen una mayor diversidad en cuanto a sus homólogos en otras especies. Además de con especies del género *Vibrio* (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. coralliilyticus*, *V. harveyi*, *V. tritonius*, *V. ostreicida*, *V. sonorensis*, *V. alginolyticus*, *V. neptunius*), presentan elevada similitud con proteínas ParD de otras especies bacterianas (*Marinomonas spartinae*, *Rheinheimera perlucida*, *Neptuniibacter pectenicola*, *Agarivorans gilvus*, *Shewanella putrefaciens*), oscilando entre el 89-76% de identidad aminoacídica y con un 100% de cobertura de la proteína (Fig. IV.13). El estudio de sus dominios proteicos reveló el dominio “*antitoxina Phd_YefM, tipo II del sistema toxina-antitoxina*” (Pfam: PF02604). Por otra parte, el servidor RAST anotó estas ORFs como ParD, antitoxina de ParE y perteneciente al sistema toxina-antitoxina ParDE.

En relación a la localización genética de estas ORFs, ParD se ubica de manera adyacente a ParE en las cepas A-162 y LD-07, estando ambas flanqueadas entre una proteína de función desconocida (nº 2 de la Fig. IV.13) y una ARN helicasa (nº 3 de la Fig IV.13), también presentes en las cepas portadoras de pPHDD1.

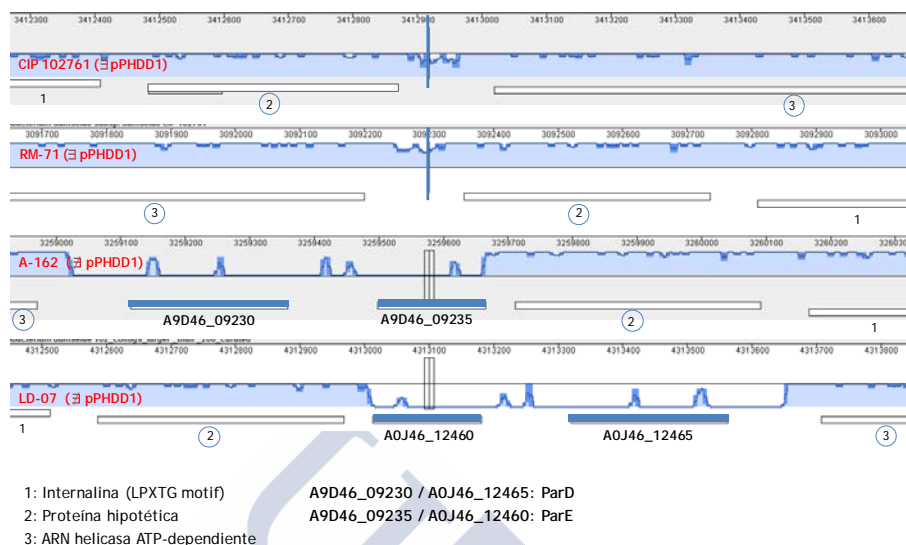


Fig. IV.13: Alineamiento de los genomas indicados de *P. damsela* subsp. *damsela* mediante el programa MAUVE. Se muestran la localización y contexto genético de las ORF A9D46_09230, A0J46_12465 (ParD) y A9D46_11035 y A0J46_12460 (ParE), ubicadas en las cepas sin plásmido A-162 y LD-07, respectivamente.

4.2.3.6. ORFs A9D46_04550/A0J46_11030 y A9D46_04555/A0J46_11035: proteínas de función desconocida

Con relación a las ORFs A9D46_04550 y A0J46_11030 (99,26% de similitud), la búsqueda por BLASTP de proteínas semejantes reveló homólogos de función desconocida y con bajo porcentaje de identidad en especies como: *Photobacterium jeanii* (27% de identidad y 90% de cobertura), *P. halotolerans* (35%, 21%) y *Vibrio vulnificus* (32%, 29%). El reconocimiento de posibles dominios proteicos no fue fructífero, siendo por lo tanto desconocida la función de estas proteínas. Resultado similar obtenemos en el estudio de las proteínas A9D46_04555/A0J46_11035 de las cepas A-162 y LD-07 (99% homología), localizadas adyacentemente. Del mismo modo, no poseen dominios proteicos conocidos, presentando homología con proteínas de función desconocida presentes en *Photobacterium leiognathi* (34% identidad, 87% cobertura), *P. jeanii* (32%, 81%) y *Moritella* sp. (34 %, 87%) (Fig. IV.14).

Como podemos observar en la Fig. IV.14, estas ORFs se ubican entre el gen de un transportador anaeróbico (nº 6 de la Fig. IV.14) y una serie de genes del ARNt, todos ellos compartidos por las cepas con pPHDD1. La presencia de genes del ARNt podría propiciar la inserción de nuevos genes, tal y como ya se ha comentado.

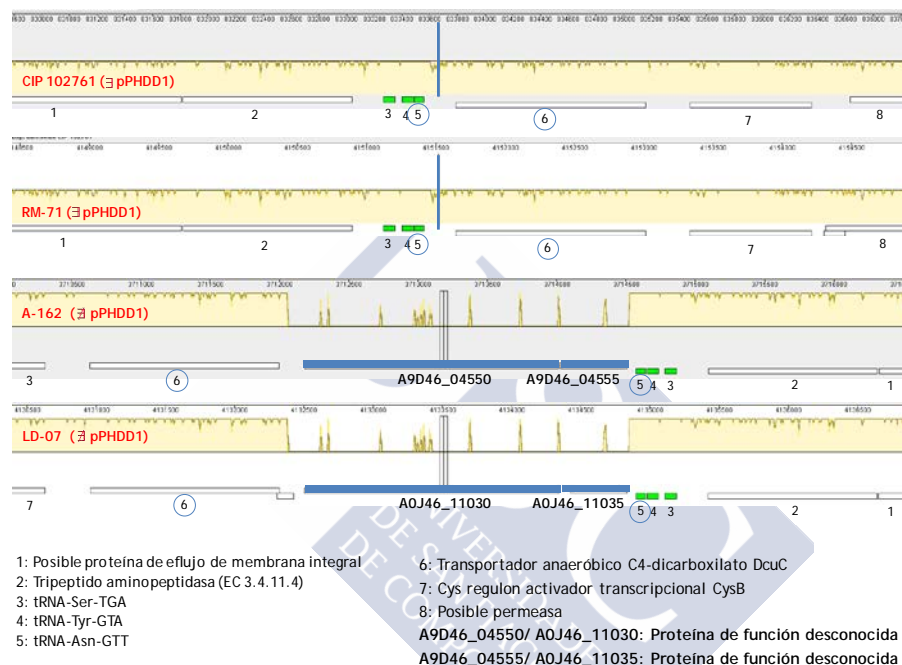


Fig. IV.14: Alineamiento de los genomas indicados de *P. damsela* subsp. *damsela* mediante el programa MAUVE. Se muestran la localización y contexto genético de las ORFs A9D46_04550, A0J46_04555 y A9D46_11030 y A0J46_11035, presentes en las cepas sin plásmido A-162 y LD-07, respectivamente.

En conclusión, como resultado de la comparación entre los genomas de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* portadoras (CIP 102761 y RM-71) y carentes de pPHDD1 (A-162 y LD-07), destacamos, por una parte, la presencia de un sistema toxina-antitoxina y, lo más interesante para el desarrollo de nuestros objetivos, un gen de una colagenasa al que denominaremos de ahora en adelante bajo el acrónimo *colP* (colagenasa de *Photobacterium*).

4.3. PHLYC CONTRIBUYE A LA HEMÓLISIS Y A LA VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE *P. DAMSELA*E SUBSP. *DAMSELA*E CARENTES DE pPHDD1

El análisis comparativo entre cepas de *P. damsela*e subsp. *damsela*e portadoras y no portadoras de pPHDD1, reveló la presencia del gen de una posible collagenasa únicamente en los aislados sin dicho plásmido. Si bien es cierto que numerosos trabajos han relacionado la capacidad de hidrolizar gelatina y/o colágeno con la virulencia bacteriana, esta bacteria ha demostrado presentar una capacidad de hidrolizar esta proteína de manera variable (Fouz *et al.*, 1993; Labella *et al.*, 2010a), lo que sugiere la presencia de otros factores de virulencia adicionales en este tipo de aislados. Teniendo en cuenta estas evidencias, sugerimos que algunos de los factores de virulencia de cepas carentes de pPHDD1 podrían ser compartidos con las cepas portadoras del mismo. Por ello, llevamos a cabo en paralelo al estudio de la actividad collagenasa (Capítulo 4.5 de Resultados y Discusión), la búsqueda de factores de virulencia potenciales compartidos por cepas con y sin plásmido.

Tal y como ya se ha mencionado en la introducción, todas las cepas hemolíticas de *P. damsela*e subsp. *damsela*e producen una hemolisina denominada fobalisina C o PhlyC (“*photobacterial lysin encoded on a chromosome*”), codificada en el cromosoma I, cuyo gen se ha denominado *hlyA_{cr}* (Rivas *et al.*, 2013b; Rivas *et al.*, 2014). Curiosamente, PhlyC presenta un 92% de identidad a nivel de su secuencia de aminoácidos con la toxina formadora de poro fobalisina plasmídica (PhlyP), codificada en el plásmido pPHDD1 (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013b; Rivas *et al.*, 2015a). Las hemolisinas son enzimas que actúan sobre las membranas de eritrocitos, lisando así las células, lo que conduce a la liberación de la hemoglobina, proteína de unión al hierro. Este hierro podría ser captado por sideróforos, o bien podría utilizarse directamente el grupo hemo de la hemoglobina. Por uno u otro mecanismo, la molécula portadora del hierro sería posteriormente interiorizada a través de receptores en la membrana celular, siendo finalmente el hierro empleado como cofactor para una gran variedad de procesos celulares. En muchos casos, la actividad formadora de poros de las hemolisinas no está restringida a los

eritrocitos, sino que se extiende a una amplia gama de tipos celulares (mastocitos, neutrófilos y células polimorfonucleares), aumentando la virulencia al causar daño tisular (Zhang & Austin, 2005). Hasta la fecha, el papel de *hlyA_{cr}* en la virulencia ha sido evaluado exclusivamente en la cepa RM-71, que también produce Dly y PhlyP, y utilizando únicamente el rodaballo como modelo animal de infección (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013b). Sin embargo, es importante destacar aquí que la gran mayoría de los aislamientos de *P. damsela* subsp. *damsela* de brotes recientes en granjas acuícolas no producen las toxinas Dly y PhlyP y han sido aislados principalmente de peces espáridos y de lubinas (Labella *et al.*, 2010a; Terceti *et al.*, 2016; Rivas *et al.*, 2014). Por ello, hemos considerado de especial importancia iniciar el estudio de la contribución del gen *hlyA_{cr}*, y por lo tanto de su producto, la fobalisina C (PhlyC), en la hemólisis, la toxicidad celular y virulencia de cepas carentes de pPHDD1, empleando como modelo animal la lubina.

4.3.1. Todos los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* que son hemolíticos en sangre de cordero, poseen el gen *hlyA_{cr}*

Tal y como se ha comentado en la introducción, recientemente, diversos estudios han identificado parcialmente la base genética de la virulencia de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* portadoras del plásmido pPHDD1. Según estas investigaciones, la patogenicidad de estas cepas bacterianas está basada en la actuación sinérgica y aditiva de la fosfolipasa Dly y las hemolisinas PhlyP y PhlyC, estando las dos primeras codificadas en pPHDD1 (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013b). Por lo tanto, se ha podido establecer una relación directa entre fenotipo hemolítico y virulencia en ratones y peces, en este tipo de aislados. Con respecto a las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* no portadoras de pPHDD1, Rivas *et al.* (2011, 2013b, 2014) demostraron que su capacidad para lisar eritrocitos era debida a la actuación de la hemolisina cromosómica PhlyC, codificada por el gen *hlyA_{cr}*, si bien estos autores no evaluaron en ningún momento la virulencia de las cepas sin plásmido.

En el presente estudio, procedimos al análisis en placas de agar con sangre de cordero (Oxoid) de 49 aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* disponibles en nuestro laboratorio (Tabla III.1 y sección 3.12.1.1 de Material y Métodos). Los resultados mostraron que la mayoría de las cepas estudiadas, con la excepción de ACRp-72.1, J3G801 y H29040401H, presentaban β -hemólisis, produciendo halos completamente transparentes alrededor de las colonias (Tabla IV.4; Fig. IV.16B). Estos datos por tanto confirman que la mayoría de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, independientemente de la presencia o no de pHDD1, son hemolíticas en sangre de oveja.

Con la finalidad de estudiar la presencia de *hlyA_{cr}* en los aislados de nuestra colección, diseñamos los cebadores *hlyAcr_interno_F* y *hlyAcr_interno_R* a partir de la secuencia nucleotídica de la cepa tipo CIP 102761 depositada en GenBank. Estos cebadores amplifican una sección interna de *hlyA_{cr}* (Tabla III.4 de Material Métodos) (Fig. IV.15A).

Los resultados obtenidos demostraron la ubicuidad de *hlyA_{cr}* en todos los aislados hemolíticos estudiados. Además, dado que *hlyA_{cr}* está ubicado en el cromosoma I y está presente también en las cepas sin plásmido, es probable que *hlyA_{pl}* tenga su origen evolutivo en un gen de localización cromosómica tipo-*hlyA_{cr}*. De acuerdo con esta hipótesis, muchas especies de *Vibrio* portan homólogos de *hlyA_{cr}* en sus cromosomas (ver más abajo, Fig. IV.18). Por el contrario, en las cepas no hemolíticas J3G-801 y ACRp-72.1 *hlyA_{cr}* no fue posible amplificar el gen completo *hlyA_{cr}* (Fig. IV.15B; Fig. IV.16; Tabla IV.4), evidencia que había sido anteriormente apuntada por Rivas *et al.* (2014). Estos autores demostraron la ausencia de *hlyA_{cr}* en las cepas ACRp-72.1 y J3G801, y evidenciaron que la tercera cepa no hemolítica, H29040401H, contenía un pseudogen de *hlyA_{cr}* causado por la inserción del gen de una transposasa. Del mismo modo, Terceti *et al.* (2016) también verificaron que tres cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* sin actividad hemolítica, aisladas de lubina en el Mar Negro, contenían elementos de inserción que rompían la pauta abierta de lectura del gen *hlyA_{cr}*.

Como conclusión preliminar de estos datos, podemos confirmar que, si bien la mayoría de los aislados presentan actividad hemolítica,

la base genética que subyace a dicha actividad puede variar entre aislados. Las cepas que secretan Dly y PhlyP, y por lo tanto portadoras del plásmido pPHDD1, exhiben un halo hemolítico más amplio que el de las cepas carentes del mismo (Fig. IV.16B). Los halos de mayor tamaño (HG) se deben a la acción conjunta de Dly, PhlyP y PhlyC; el fenotipo de halo intermedio (HM) presentado por la cepa tipo CIP 102761 y por H01100402O posiblemente es causado por sustituciones aminoacídicas en PhlyP, PhlyC o en ambas, lo que probablemente disminuya la actividad de las hemolisinas; PhlyC es la responsable del halo pequeño (HP) exhibido por las cepas carentes de pPHDD1 (Fig. IV.16A).

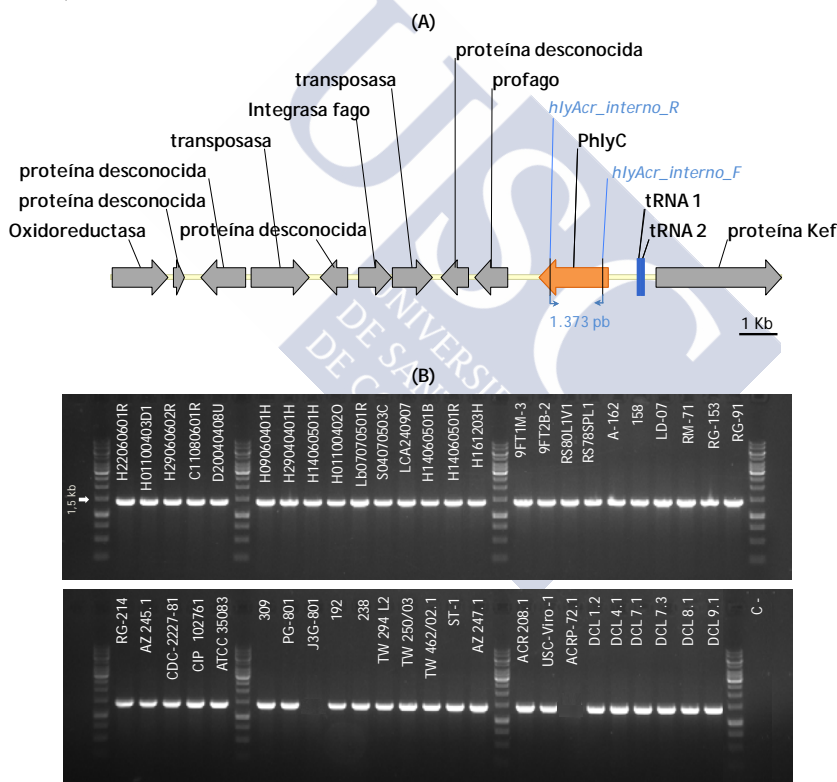


Fig. IV.15: (A) Representación esquemática del contexto genético de *hlyA_{cr}* (VDA_002420) en la cepa tipo CIP 102763, e hibridación de los cebadores empleados en la búsqueda del mismo. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del gen *hlyA_{cr}* en 49 aislados de *P. damsela* subsp. *damsela*. Flecha blanca: banda de 1,5 Kb (marcador de peso molecular 1 Kb, O'GeneRuler).

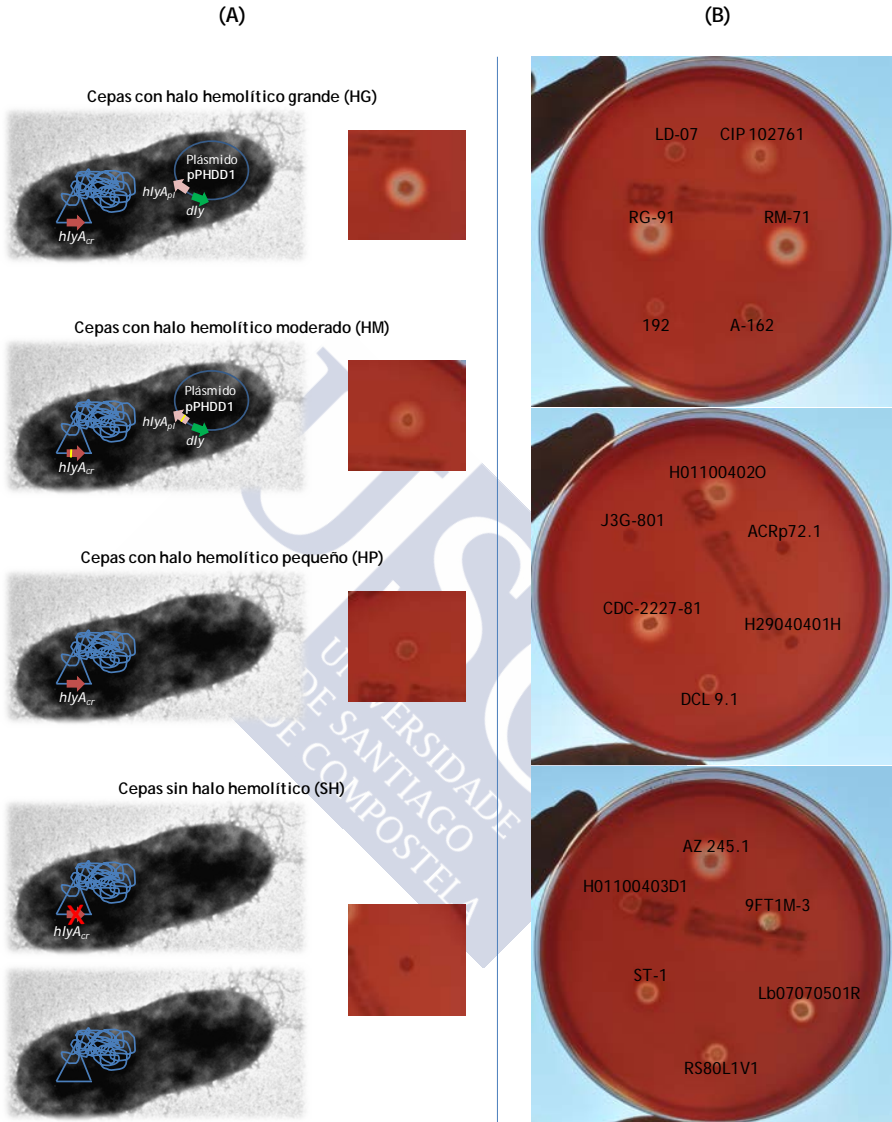


Fig. IV.16: (A) Representación esquemática de las bases genéticas de los diversos fenotipos hemolíticos observados en *P. damsela* subsp. *damsela* (basado en los estudios de Rivas *et al.* (2011, 2013a, 2013b y 2014). (B) Fenotipos hemolíticos de diversos aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* en placas de agar sangre de oveja (Oxoid) tras incubación a 25 °C durante 24 h.

Tabla IV.4: Resultados del análisis mediante PCR para los marcadores genéticos y pruebas fenotípicas indicados, en los 49 aislados de Photobacterium damsela subsp. damsela (Pdd) analizados.

Cepas de Pdd	Hospedador/Procedencia	pPHDD1 ^a	pPHDD203	Actividad hemolítica ^b	hlyA _{cr}	Actividad caseinasa		Actividad gelatinasa		Activ. fosfolipasa		Actividad lipasa	
						Test ^c	colP	Test ^d	plpV	Test ^e	Tween-80	Tween-20	
H22060601R	Pargo, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	-	+
H01100403D1	Pargo, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	+	+
H29060602R	Pargo, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	-	+
C11080601R	Corvina, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	+	+
D20040408U	Dorada, España	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
H09060401H	Pargo, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	-	+
H29040401H	Pargo, España	-	-	SH	+	-	+	+	+	+	+	+	+
H14060501H	Pargo, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	-	+
H01100402O	Pargo, España	+	-	HG	+	-	+	+	+	++	+	+	+
Lb07070501R	Lubina, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	+	+
S04070503C	Sargo común, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	+	+
LCA240907	Barramundi, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	+	+
H14060501B	Pargo, España	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	+	+
H14060501R	Pargo, España	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	-	+
H161203H	Dorada, España	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
9FT1M-3	Tiburón, EEUU	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
9FT2B-2	Tiburón, EEUU	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RS80L1V1	Pargo, EEUU	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	-	+
RS78SPL1	Pargo, EEUU	-	-	HP	+	-	-	-	-	+	+	+	+
162	Anguila, Bélgica	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
158	Anguila, Bélgica	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
LD-07	Dorada, España	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RM-71	Rodaballo, España	+	-	HG	+	-	-	-	-	++	+	+	+
RG-153	Rodaballo, España	+	-	HG	+	-	-	-	-	++	+	+	+
RG-91	Rodaballo, España	+	-	HG	+	-	-	-	-	++	+	+	+
RG-214	Rodaballo, España	+	-	HG	+	-	-	-	-	++	+	+	+
AZ 245.1	Rodaballo, España	+	-	HG	+	-	-	-	-	++	+	+	+

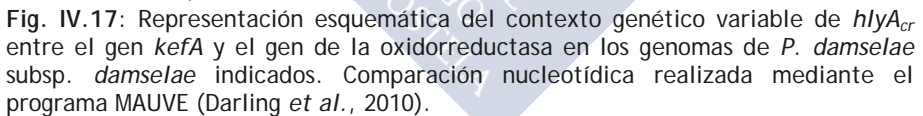
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepas de <i>Pdd</i>	Hospedador/Procedencia	pPHDD1 ^a	pPHDD203	Actividad hemolítica ^b	<i>hlyA_{cr}</i>	Actividad caseinasa	Actividad gelatinasa		Activ. fosfolipasa		Actividad lipasa		
							Test ^c	<i>colP</i>	Test ^d	<i>plpV</i>	Test ^e	<i>lip80</i>	Test ^f
CDC-2227-81	Humano, EEUU	+	-	HG	+	-	-	-	++	+	+	+	+
CIP 102761	Pez doncella, EEUU	+	+	HM	+	-	-	-	++	+	+	+	+
ATCC 35083	Tiburón marrón, EEUU	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	-	-	+
309	Mejillón, España	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
PG-801	Camarón, Taiwan	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
J3G-801	Camarón, Taiwan	-	-	SH	-	-	-	-	+	+	-	-	+
192	Delfin, EEUU	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
238	Delfin, EEUU	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TW 294 L2	Lubina, España	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
TW 250/03	Dorada, España	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
TW 462/02.1	Dorada, España	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
ST-1	Trucha, EEUU	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
AZ 247.1	Rodaballo, España	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
ACR 208.1	Rodaballo, España	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	-	-	+
USC-Viro-1	Rodaballo, España	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
ACRP-72.1	Rodaballo, España	-	-	SH	-	-	-	-	+	+	+	+	+
DCL 1.2	Dorada, España	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+
DCL 4.1	Dorada, España	+	-	HG	+	-	-	-	++	+	+	+	+
DCL 7.1	Dorada, España	+	-	HG	+	-	+	+	++	+	+	+	+
DCL 7.3	Dorada, España	+	-	HG	+	-	-	-	++	+	+	+	+
DCL 8.1	Dorada, España	-	-	HP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
DCL 9.1	Dorada, España	-	-	HP	+	-	-	-	+	+	+	+	+

^aLa presencia de pPHDD1 se evaluó mediante PCR dirigida al gen de la damselisina (*dly*). ^bActividad hemolítica realizada en placas de TSA-1 suplementadas con 5% de sangre de oveja (Oxoid); (SH) sin halo, (HP) halo pequeño, (HM) halo moderado, (HG) halo grande. ^cPrueba de la actividad gelatinasa realizada en placas de TSA-1 suplementadas con 3% de gelatina. ^dActividad fosfolipasa estudiada en placas de TSA-1 suplementadas con 3% de yema de huevo. (+) halo medio (cepas que solo producen PlpV), (++) halo grande (cepas que producen Dly y PlpV). ^eActividad lipolítica testada en placas de TSA-1 suplementadas con 1% de tween 80. ^fActividad lipolítica testada en placas de TSA-1 suplementadas con 1% de tween 20.

4.3.2. El gen *hlyA_{cr}* presenta distintos contextos genéticos en los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* estudiados

Si bien ya hemos demostrado, en consonancia con los resultados aportados por Rivas *et al.* (2013b; 2014), que todos nuestros aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* hemolíticos presentan en su cromosoma I el gen *hlyA_{cr}*, el siguiente paso a seguir fue el de estudiar su contexto genético. Para ello, analizamos el entorno del gen *hlyA_{cr}* en los cuatro genomas secuenciados en este trabajo. Tal y como podemos observar en la Fig. IV.17, el gen *hlyA_{cr}* muestra contextos diferentes en cada cepa pero siempre flanqueado por los genes que codifican una oxidorreductasa y una posible proteína de canal KefA. Esta observación sugiere que la región cromosómica en la cual se encuentra el gen *hlyA_{cr}*, podría constituir un punto caliente de recombinación de ADN. El número de genes variables que constituyen ese punto caliente varían de uno a once en las cuatro cepas analizadas. La similitud de las secuencias nucleotídicas de *kefA* y el gen de la oxidorreductasa entre los genomas analizados es del 100% de identidad y 100% de cobertura, lo que indica que son genes conservados en esta especie. Además, la presencia de genes relacionados con la movilidad de ADN como pueden ser elementos de inserción o genes del ARNt, podría haber impulsado la hipervariabilidad en esta región cromosómica (Fig. IV.17). Diversos autores han enfatizado el papel que desempeñan los ARNt en la adquisición de ADN (Hou, 1999), y que los elementos de inserción que flanquean las islas de patogenicidad a menudo se localizan en zonas próximas a los genes ARNt (Blum *et al.*, 1994). Por otro lado, mientras que *hlyA_{cr}* está ubicado en el cromosoma I de *P. damsela* subsp. *damsela*, en otras especies de la familia *Vibrionaceae* la hemolisina está codificada en el cromosoma II, como es el caso de *V. fluvialis* (Khatri *et al.*, 2013), *V. anguillarum* (Naka *et al.*, 2011) o *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000). En general, podríamos considerar por tanto a esta región variable como un punto caliente de ensamblaje del genoma donde han ocurrido eventos “*indel*” (inserciones y deleciones), incluidos aquellos que han afectado a la adquisición o pérdida de *hlyA_{cr}*.



Las hemolisinas son enzimas producidas por una gran cantidad de especies bacterianas diversas tales como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o diferentes especies del género *Vibrio* (Zhang & Austin, 2005). La búsqueda de enzimas homólogas a la hemolisina PhlyC mediante el servidor BLASTP, manifestó su similitud con hemolisinas de varias especies de la familia *Vibrionaceae* y *Aeromonadaceae*, la

mayoría de ellas, patógenas de animales marinos y algunas patógenas oportunistas de humanos. La proteína PhlyC de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* (A0J46_02060), muestra similitudes muy elevadas con las secuencias aminoacídicas de diversas hemolisinas cromosómicas de aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* disponibles en las bases de datos: VDA_002420 de la cepa CIP 102761, A0J47_02585 de RM-71, A9D46_00870 de A-162, AHL64232 de RG-91 y AHL64205 de 402O. Todas ellas presentan unos valores del 99% de identidad y 100% de cobertura. Asimismo, la hemolisina codificada en pPHDD1 (PhlyP) de diversas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, presenta un 92% de identidad y 100% de cobertura: VDA_000160 de CIP 102761, A0J47_15440 de RM-71. Por otro lado, PhlyC muestra homología con hemolisinas de *Photobacterium* spp.: *P. profundum* (46% identidad, 98% cobertura), *P. leiognathi* (44%, 97%), *P. piscicola* (46%, 90%), *P. jeanii* (40%, 93%), *P. swingsii* (41%, 100%), *P. sanguinancrri*, (39%, 99%).

Además, la hemolisina PhlyC está íntimamente relacionada con las de otras especies de la familia *Vibrionaceae*: *Aliivibrio fischeri* (60% identidad, 100% cobertura), *Aliivibrio wodanis* (59%, 100%), *V. anguillarum* (50%, 96%), *V. mimicus* (49%, 98%), *V. parahaemolyticus* (49%, 100%), *V. metschnikovii* (49%, 98%), *V. furnissii* (48%, 93%), *V. alginolyticus* (49%, 93%), *V. fluvialis* (47%, 98%), *V. campbellii* (48%, 97%), *V. metoecus* (48%, 98%), *V. harveyi* (48%, 97%), *V. cholerae* (48%, 98%), entre otros. Asimismo, también muestra homología con aerolisinas (familia de toxinas formadoras de poro) de *Aeromonas* spp.: *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* (46% identidad, 94% cobertura), *A. piscicola* (46%, 94%), *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (46%, 94%) o *A. hydrophila* (46%, 93%).

Para comprender mejor las relaciones filogenéticas entre homólogos, se realizó un análisis filogenético empleando el método Neighbor-Joining (1000 bootstraps) (Saitou & Nei, 1987). Como podemos observar en el árbol obtenido, la gran distancia genética que separa los homólogos HlyA de diferentes especies sugiere una asociación a largo plazo de genes *hlyA* con *Vibrionaceae* y especies de *Aeromonadaceae*. Por otro lado, nos llama la atención que las hemolisinas de *P. jeanii*, *P. swingsii* y *P. sanguinancrri* se agrupen

independientemente del resto de las del género *Photobacterium*, a pesar de que presentan los mismos dominios proteicos que PhlyC, por ejemplo (datos no mostrados). Con respecto a *P. damsela* subsp. *damsela*, el análisis filogenético exhibió dos ramas bien definidas, una que comprende las secuencias de PhlyC y otra que incluye las de la hemolisina plasmídica PhlyP (Fig. IV.18). La gran similitud a nivel aminoacídico entre las dos hemolisinas de *P. damsela* subsp. *damsela* (cromosómica y plasmídica, respectivamente), en comparación con sus homólogos en otras especies, sugiere que las dos versiones de genes *hlyA_{cr}* y *hlyA_{pl}*, tienen su origen en un único gen original, y son el resultado de un evento de duplicación génica y posterior divergencia en *P. damsela* subsp. *damsela*.

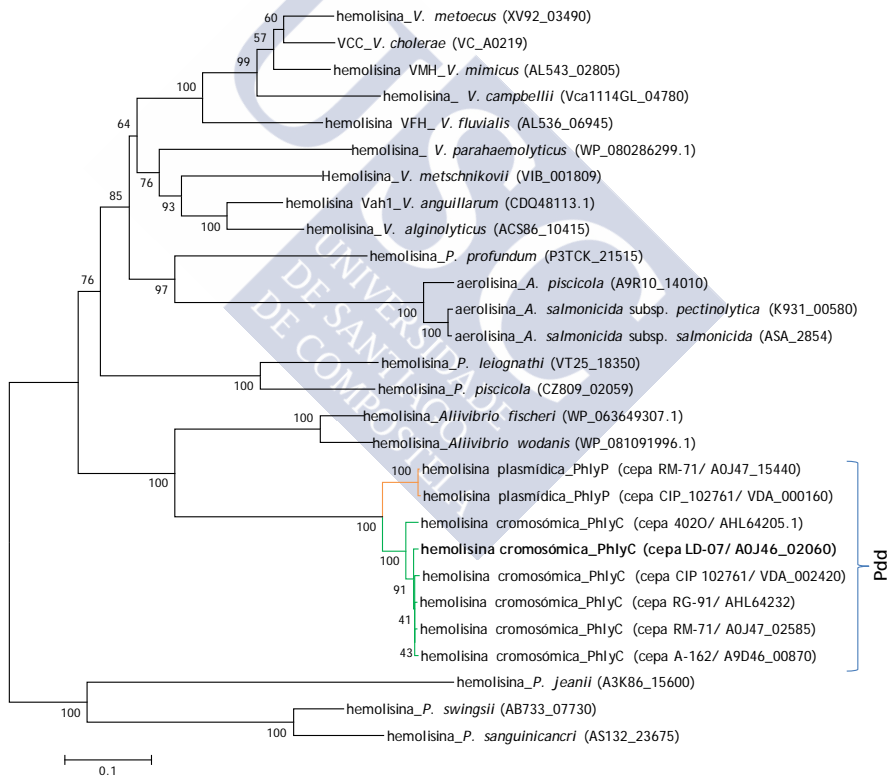


Fig. IV.18: Árbol filogenético de las proteínas homólogas a la hemolisina PhlyC de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* (Pdd). Entre paréntesis se indican los códigos de acceso de GenBank. El árbol filogenético se construyó empleando el método Neighbor-joining (1000 bootstraps) con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

Llegados a este punto, es necesario mencionar que generalmente a las enzimas capaces de lisar eritrocitos se les denomina hemolisinas, pero estas toxinas pueden obedecer a modos de acción diferentes, que pueden corresponder bien al mecanismo de una toxina formadora de poro (TFP), o bien al de una fosfolipasa (Sun *et al.*, 2007). Por ello, la hemólisis puede ser el resultado, no de la acción de una toxina formadora de poro tipo PhlyC, sino también de la actividad de una fosfolipasa como sucede con la fosfolipasa C de *Pseudomonas aeruginosa* o la damselisina de *P. damsela* subsp. *damsela*. En ocasiones podemos toparnos con proteínas anotadas como hemolisinas que en realidad son fosfolipasas con actividad hemolítica adicional, como acontece con las fosfolipasas TLH/LDH de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* o VHH de *V. harveyi*. Sin embargo, la mayoría de las denominadas hemolisinas actúan como proteínas formadoras de poro. En este apartado, el término hemolisina hace referencia a las TFP. Las hemolisinas homólogas a PhlyC corresponden todas ellas a enzimas consideradas como toxinas formadoras de poro, destacando la citolisina VCC de *V. cholerae* y la fobalisina plasmídica PhlyP de *P. damsela* subsp. *damsela* (Rivas *et al.*, 2015a) o VHH de *V. mimicus* (Shinoda *et al.*, 1993; Miyoshi *et al.*, 1997), pertenecientes a la clase β -TFP; o las aerolisinas (α -TFP) de *Aeromonas* spp. (Los *et al.*, 2013), entre otras.

4.3.4. Estudio *in silico* de la hemolisina PhlyC de la cepa LD-07 (Δ pPHDD1) de *P. damsela* subsp. *damsela*

El gen *hlyA_{cr}* consta de 1.809 pb, cuya proteína predicha PhlyC (A0J46_02060) está constituida por 603 aminoácidos, con una masa teórica de 68,14 KDa (proteína madura sin péptido señal: 65,72 KDa) y punto isoeléctrico de 5,16 (Stothard, 2000). Además, como podemos observar en la Fig. IV.19A, la predicción de la estructura secundaria de PhlyC realizada con el servidor Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015), y empleando como modelo la estructura secundaria descrita de la toxina formadora de poro VCC de *Vibrio cholerae* (PDB 1XEZ) (Olson & Gouaux, 2005), reveló que esta enzima presenta la estructura típica de la clase de proteínas β . Este tipo de proteínas están compuesta en su totalidad por láminas- β , con la posible excepción de una pocas

hélices- α en la periferia (Hubbard *et al.*, 1999). Concretamente, PhlyC exhibe una arquitectura a modo de sándwich con 10 hebras en dos láminas (Hubbard *et al.*, 1999).

Trabajos recientes llevados a cabo con la hemolisina PhlyP de *P. damsela* subsp. *damsela* (codificada por el gen *hlyA_{pl}* en pPHDD1), han demostrado su clasificación como una toxina formadora de poro, pasando a ser nombrada fobalisina P (Rivas *et al.*, 2015a). Asimismo, Rivas *et al.* (2013b) habían resaltado el alto porcentaje de similitud entre las toxinas PhlyC y PhlyP de la cepa RM-71 (92% similitud), dejando entrever posteriormente que la hemolisina cromosómica codificada por *hlyA_{cr}* podría ser también una toxina formadora de poro (Rivas *et al.*, 2015a). Las toxinas formadoras de poro son enzimas sintetizadas por un gran número de bacterias, que se clasifican en dos grupos α -TFP y β -TFP, en función de si la estructura secundaria de sus elementos que abarcan la membrana está compuesta de α -hélices o β -barriles, respectivamente (Dal Peraro & van der Goot, 2016). Varias familias se han descrito dentro de cada una de las clases: las familias de las colicinas, citolisinas A (ClyA), actinoporinas y RTX en α -TFP, y las familias de las hemolisinas, aerolisinas y citolisinas dependientes de colesterol (CDC) en β -TFP (Dal Peraro & van der Goot, 2016). Este tipo de toxinas son secretadas como monómeros solubles en agua, que experimentan una serie de cambios conformacionales al unirse a las membranas de las células diana, lo que lleva a la formación de complejos de poro transmembrana oligoméricos (Iacovache *et al.*, 2008). El número de monómeros constituyentes de la estructura final varía, así por ejemplo, nos encontramos con los cinco monómeros de PhlyP (Rivas *et al.*, 2015a), los siete de VCC (Krasilnikov *et al.*, 2007) o los 50 de las citolisinas dependientes de colesterol (CDC) (Gonzalez *et al.*, 2008). A pesar de compartir el mismo modo de acción, hay importantes diferencias estructurales y funcionales entre las toxinas de las diferentes familias (Tilley & Saibil, 2006). Las TFP pueden ocasionar daño directo sobre las células diana (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1986), promover el escape de compartimentos de membrana (Hamon *et al.*, 2012) o introducir factores de virulencia en el citosol (Krantz *et al.*, 2006). Las toxinas formadoras de poro se caracterizan, tal y como su nombre sugiere, por

horadar la membrana plasmática de la célula eucariota diana a través de la creación de poros. Una de las toxinas de este tipo mejor estudiadas es la citolisina VCC de *V. cholerae* (De & Olson, 2011; Olson & Gouaux, 2003; Zitzer *et al.*, 2001). El efecto citotóxico descrito en VCC reside en la formación de canales oligoméricos de tipo barril- β en la membrana de la célula, llevando a una hinchazón y posterior lisis osmótica coloidal de la misma. Es conveniente resaltar que VCC se sintetiza en forma de monómeros que permanecen en disolución, y que posteriormente oligomerizan entre ellos formando heptámeros al contactar con la membrana celular (Krasilnikov *et al.*, 2007) (Fig. IV.20).

El análisis de los dominios proteicos de PhlyC de LD-07 (Fig. IV.19C) llevado a cabo mediante la información aportada por los estudios estructurales de la citolisina VCC de Olson & Gouaux (2005), y sustentada por la predicción realizada por el servidor bioinformático SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (Letunic & Bork, 2017), reveló la presencia de un pro-dominio (posiciones 45 a 155), un dominio citolisina (posiciones 156 a 479) y un dominio lectina (posiciones 480 a 595). A continuación detallaremos en profundidad cada uno de estos dominios, utilizando la citolisina VCC descrita en *Vibrio cholerae* como referencia.

El primer dominio que localizamos en PhlyC, después del péptido señal predicho, es el dominio N-terminal o pro-dominio (Fig. IV.19BC). En la citolisina VCC, el pro-dominio actúa a modo de chaperona guiando el plegamiento de la protoxina (Nagamune *et al.*, 1997), por lo que es necesario para una correcta flexibilidad estructural durante el proceso de secreción (Paul & Chattopadhyay, 2011). Además, este dominio parece bloquear las interacciones entre protómeros y prevenir la oligomerización (Olson & Gouaux, 2005). La ubicación del pro-dominio por lo tanto, explica por qué la protoxina es inactiva y por qué es necesaria la eliminación del pro-dominio a través de proteólisis para la activación de la toxina. Así por ejemplo, las proteasas ubicadas en la membrana de la célula hospedadora (Valeva *et al.*, 2004) o en el medio extracelular (Nagamune *et al.*, 1996) escinden el pro-dominio de VCC con la consecutiva activación, oligomerización y formación de poros

transmembrana (Fig. IV.20). Por el contrario, si bien PhlyP codifica una pequeña β -PFT que también se produce como una protoxina, PhlyP parece estar ya en forma madura en los productos extracelulares (Rivas *et al.* 2015a).

Por otro lado, el proceso de oligomerización y formación de poro requiere de una serie de cambios conformacionales mediados por interacciones proteína-proteína (Lohner *et al.*, 2009), en los que los enlaces disulfuro juegan un papel clave (Valeva *et al.*, 2005). Como podemos observar en la Fig. IV.19C, PhlyC contiene en las mismas posiciones los seis residuos de cisteína presentes en VCC (Valeva *et al.*, 2005), por lo que PhlyC podría tener los mismos enlaces disulfuro y, por lo tanto, un plegamiento similar al presentado por VCC.

A continuación del dominio N-terminal o pro-dominio, nos encontramos con el dominio citolítico (Fig. IV.19BC), considerado como el núcleo estructural y funcional de VCC (Oslon & Gouaux, 2005). Este dominio está relacionado con la familia Aerolisina/Hemolisina/Leucocidina de las toxinas formadoras de poro (Finn *et al.*, 2016). De hecho, la predicción de dominios mediante SMART y Pfam, denomina a este dominio como dominio leucocidina (código acceso Pfam: PF07968). Dentro de este dominio, es conveniente destacar la presencia de la región denominada “*pre-stem*” (Fig. IV.19BC), que corresponde a la zona de penetración en la membrana plasmática. Una vez que los monómeros polimerizan, esta región se despliega para permitir así anclarse en la membrana (De & Olson, 2011) (Fig. IV.20). En VCC, la P₃₂₈ presente en esta zona constituye el punto de giro de las dos láminas antiparalelas de cada monómero. Además, los aminoácidos que siguen a esta prolina muestran una hidrofobicidad alternante al menos en los ocho residuos siguientes (Valeva *et al.*, 2005). PhlyC, muestra esta prolina en una posición muy cercana (P₃₂₄), y además también presenta dicha alternancia en la hidrofobicidad de los aminoácidos posteriores (Fig. IV.19BC). Estos datos sugieren que PhlyC y VCC muestran una arquitectura común en la región de la enzima que atraviesa la membrana plasmática.

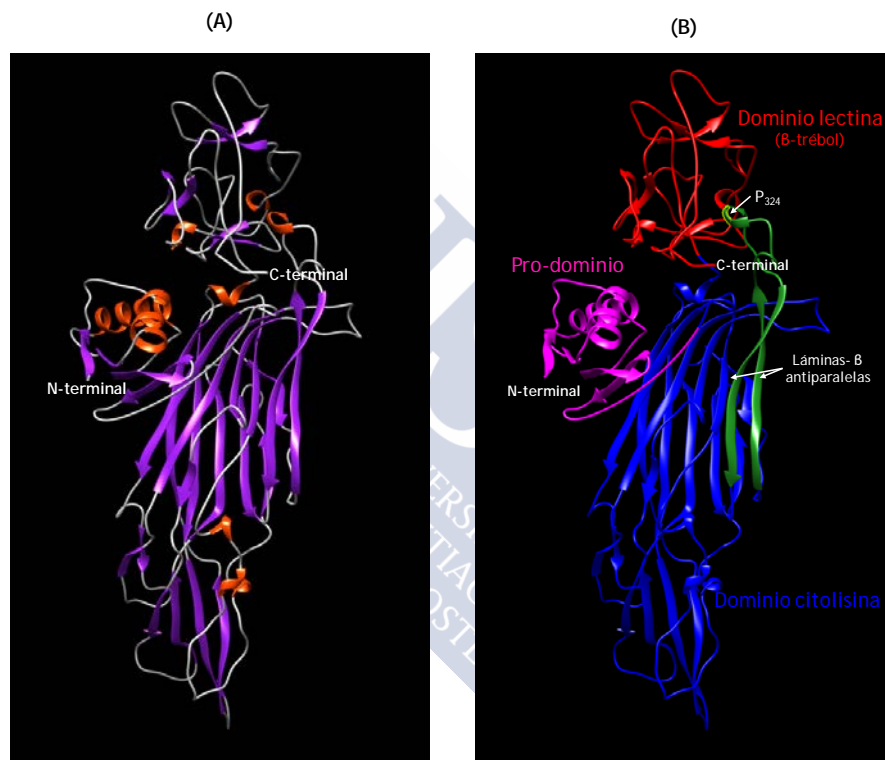


Fig. IV.19: (A) Estructura secundaria para PhlyC predicha por Phyre2 (cobertura del 87% de los residuos aminoacídicos con una confianza > del 90%) y editada con Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). (B) Dominios proteicos predichos para PhlyC. En magenta se indica el pro-dominio, en azul el dominio citolisina o citolítico, en verde la zona “*pre-stem*” o pre-tallo, y en rojo el dominio lectina.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

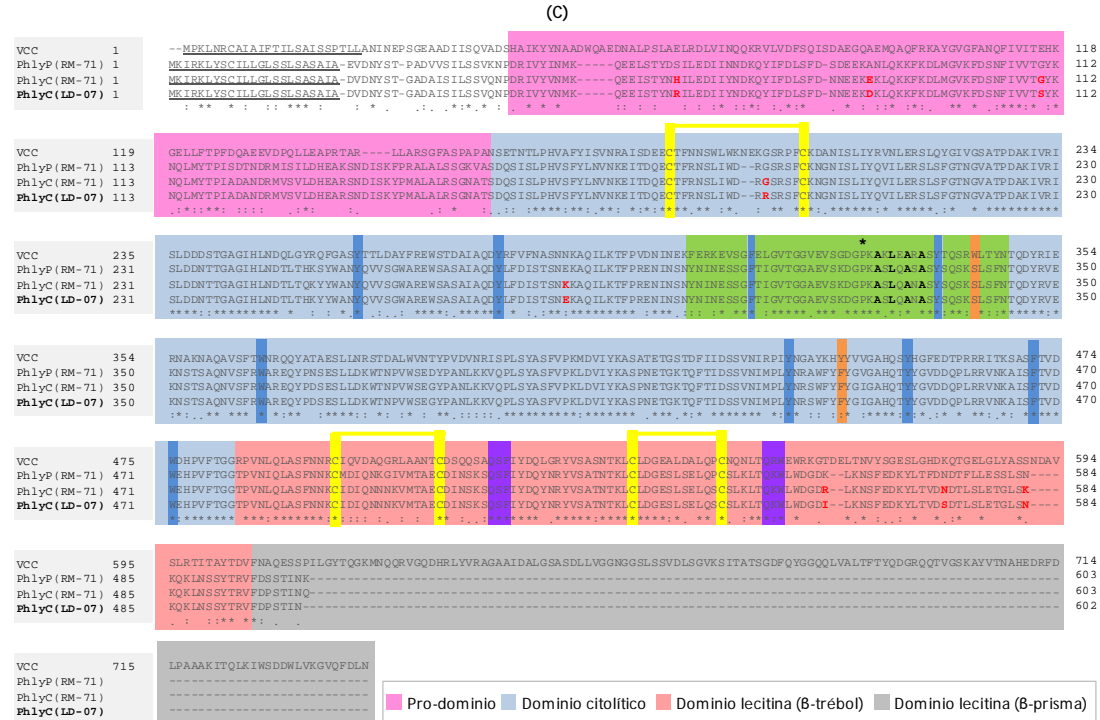


Fig. IV.19 (Cont.): (C) Alineamiento aminoacídico y dominios de las hemolisinas PhlyP y PhlyC de la cepa RM-71, y PhlyC de la cepa LD-07, con la citolisina VCC de *Vibrio cholerae*. Las secuencias subrayadas corresponden a péptidos señal predichos. En verde se señala el dominio transmembrana y en asterisco la prolina que separa las dos láminas beta antiparalelas. Se resaltan en negrita los residuos conservados posteriores a la prolina₃₂₄ de alternancia de hidrofobicidad. En amarillo, se muestran los residuos de cisteína. En azul oscuro se resaltan los residuos aromáticos con posiciones relevantes conservadas y en naranja las diferentes. En violeta los motivos QsW conservados en el dominio lecitina. Las letras en rojo y negrita indican los residuos aminoacídicos distintos entre la fobalisina C de la cepa RM-71 y la fobalisina C de la cepa LD-07. Análisis realizado mediante Clustal Omega: (*) coincidencia aminoacídica exacta (:) coincidencia alta (.) coincidencia.

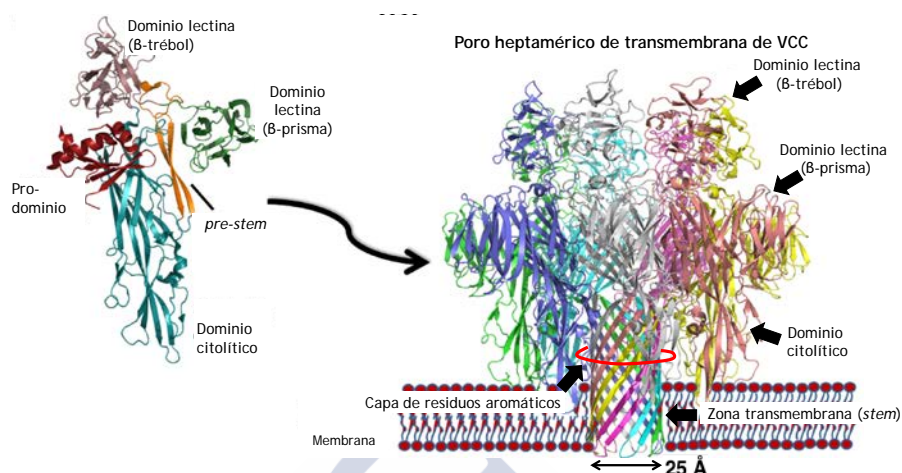


Fig. IV.20: Representación de la estructura del monómero soluble en agua e inactivo de VCC (a la izquierda) y ensamblaje de la citolisina VCC, formada por los siete monómeros, en la membrana de la célula eucariota diana (a la derecha). Imagen modificada de Khilwani & Chattopadhyay (2015) (CC), basándose en la información aportada por De & Olson (2011).

En el mismo orden de ideas, Olson & Gouaux (2003) establecieron una serie de residuos aromáticos en VCC, que ocupan posiciones relevantes en el dominio transmembrana y la región que está en contacto con la membrana plasmática (Y₃₃₈, W₃₆₇, Y₄₃₈, Y₄₄₅, W₄₇₅, Y₂₆₀, Y₂₇₉, F₃₁₃, W₃₄₃, Y₄₅₄ y F₄₇₁). Al comparar estas posiciones en PhlyC, observamos un total de nueve coincidencias, una sustitución de tipo conservativo (Y₄₄₅ por F₄₄₁) y una diferencia (W₃₄₃ por S₃₃₉), lo que vuelve a sugerir un plegamiento similar (Fig. IV.19C). Asimismo, las proteínas de tipo barril- β se caracterizan por mostrar una capa de aminoácidos aromáticos cerca de la interfase lípido/solvente (Gouaux, 1998). En VCC este anillo está formado por los aminoácidos aromáticos F₃₁₃ y Y₃₃₈ (De & Olson, 2011), residuos conservados también en PhlyC (posiciones F₃₀₉ e Y₃₃₄) (Fig. IV.19C; Fig. IV.20). Otro hecho a tener en cuenta, es el tamaño del poro creado por la toxina formadora de poro. Con respecto a VCC, el punto más estrecho del canal está formado por los siete residuos del aminoácido aromático triptófano (W₃₄₃) (De & Olson, 2011). Como se puede apreciar en la Fig. IV.19C, PhlyC presenta en ese punto una serina (S₃₃₉),

aminoácido mucho más pequeño. Esta diferencia aminoacídica podría verse reflejada en un mayor tamaño del poro. Cabe citar que esta variación no solo es exclusiva de *P. damsela* subsp. *damsela*, ya que muchas especies del género *Vibrio* presentan esta serina e incluso *V. vulnificus* muestra una treonina (datos no mostrados). Por su parte, las especies del género *Aeromonas* parecen tener glicina como residuo conservado (datos no mostrados).

Otro residuo a tener en cuenta en el dominio catalítico de VCC es el triptófano W₃₆₇, responsable de la formación de un bolsillo de unión para un grupo lipídico (Olson & Gouax, 2003). La hemolisina PhlyC muestra también un triptófano en esta posición (W₃₆₃), por lo que podría mantener la misma función (Fig. IV.19C). Todos estos datos aportados acerca del dominio citolítico, ponen de manifiesto que el núcleo principal de PhlyC comparte homología funcional con VCC.

Continuando con la descripción de los dominios proteicos localizados en PhlyC de la cepa LD-07, al igual que VCC, presenta un dominio lectina (β -trébol). Debemos destacar que la hemolisina PhlyC de LD-07, al igual que PhlyP (Rivas *et al.*, 2015a) y que las de *Aeromonas*, no presenta el segundo dominio lectina (β -prisma) mostrado por VCC (Fig. IV.19C). Este tipo de dominios están implicados en la unión a carbohidratos, los cuales posiblemente sean las moléculas de la membrana plasmática de la célula diana que reconozca la toxina. Además, también se llegaría a demostrar que el plegamiento de proVCC a su conformación nativa es dependiente del dominio β -trébol (Mukherjee *et al.*, 2016). Por su parte, la eliminación del dominio β -prisma en VCC provocó la pérdida de la actividad hemolítica (Mazumdar *et al.*, 2011), lo que llevó a la conclusión de que el dominio β -trébol está inactivo en esta toxina (Kaus *et al.*, 2014). Con respecto a PhlyP, el dominio β -trébol sí está activo (Rivas *et al.*, 2015a). Por otro lado, generalmente en el dominio β -trébol nos encontramos con dos o tres puentes disulfuro conservados, así como tres motivos QsW (Olson & Gouax, 2003). VCC y PhlyC presentan dos puentes disulfuro y dos dominios QsW (Fig. IV.19C).

Si bien no hemos comparado en detalle las hemolisinas PhlyP y PhlyC de RM-71 con PhlyC de LD-07, podríamos afirmar que las tres hemolisinas se comportan igual en cuanto a los aminoácidos clave

analizados a lo largo de esta sección, pero no en cuanto a su actividad, ya que Rivas *et al.* (2013b) han descrito que PhlyP es más hemolítica en sangre de cordero que PhlyC (en la cepa RM-71) cuando Dly no está presente. Estos datos insinúan, bien la existencia de otros residuos que podrían interferir en la actividad hemolítica, o bien la presencia de factores de regulación diferenciales para cada variante de fobalisina.

El análisis *in silico* llevado a cabo con la hemolisina cromosómica de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*, sugiere que estamos ante una hemolisina que forma parte de las denominadas toxinas formadoras de poro, sintetizadas como monómeros y que oligomerizan en pentámeros, formando un poro transmembrana, al igual que sucede con su homóloga PhlyP (Rivas *et al.*, 2015a).

4.3.5. PhlyC es la responsable de la capacidad hemolítica de *P. damsela* subsp. *damsela* LD-07 en sangre de oveja y de conejo

Con el objetivo de desentrañar la contribución de PhlyC al fenotipo hemolítico observado en cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1, construimos en primer lugar, un mutante por intercambio alélico del gen *hlyA_{cr}* (AVL63), y posteriormente, analizamos la actividad hemolítica del mismo. El procedimiento para la obtención de mutantes por intercambio alélico se explica en el apartado 3.8.2 de Material y Métodos. Los cebadores utilizados para la obtención del mutante AVL63 se muestran en la Tabla III.6 (sección 3.8.2 de Material y Métodos). Puesto que *P. damsela* subsp. *damsela* es una bacteria marina que causa infecciones tanto en animales marinos como en humanos, hemos evaluado el fenotipo hemolítico de la cepa parental (AVL49) y del mutante AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$) en placas de agar con sangre procedente de animales homeotermos (oveja y conejo) y poiquilotermos (trucha). Los ensayos de hemólisis se realizaron a 25 °C para los tres tipos de sangre. Además, se efectuaron ensayos de hemólisis en líquido en sangre de oveja y conejo con los sobrenadantes de los cultivos y con los productos extracelulares (ECPs) respectivamente, de las cepas anteriores (sección 3.12.1.2 de Material y Métodos).

Tal y como podemos observar en la Fig. IV.21A, los eritrocitos de cada especie muestran diferentes susceptibilidades a ser hemolizados por la cepa parental AVL49. Por el contrario, la cepa AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$) pierde la capacidad de lisar los eritrocitos cuando se trata de sangre de oveja y de conejo (Fig. IV.21A). Estos resultados corroboran el estudio realizado por Rivas *et al.* (2013b), en el que demuestran que una cepa sin plásmido pPHDD1, y con una mutación por inserción en el gen que codifica PhlyC, pierde la capacidad de lisar eritrocitos de oveja. En contraposición, la cepa mutante para $hlyA_{cr}$ exhibe todavía una cierta hemólisis cuando interacciona con eritrocitos de trucha, a pesar de que el halo hemolítico es turbio y no translúcido (Fig. IV.21A). En cambio, en los experimentos de Rivas *et al.* (2013b), una cepa portadora de pPHDD1 a la que se le había deletado los genes que codifican para Dly, PhlyC y PhlyP, no fue capaz de lisar los eritrocitos de rodaballo.

Los ensayos de hemólisis en líquido en sangre de oveja y conejo apoyaron los resultados obtenidos en los medios en placas con agar. Como se observa en la Fig. IV.21B, los productos extracelulares (3 mg/mL) y los sobrenadantes (de cultivos $DO_{600}=2$) de la cepa AVL49 (secciones 3.10 y 3.11 de Material y Métodos), fueron capaces de lisar los eritrocitos de conejo y los de oveja, respectivamente. Por el contrario, en el tratamiento con ECPs y sobrenadantes del mutante AVL63, los eritrocitos no experimentaban daño alguno (Fig. IV.21B).

Curiosamente, las toxinas formadoras de poro homólogas a PhlyC presentan, al igual que ésta, capacidad hemolítica frente a eritrocitos de diversas especies de mamíferos, e incluso, de animales poiquilotermos, como es el caso de las hemolisinas VAH1 y PhlyP de los patógenos de peces *V. anguillarum* y *P. damselae* subsp. *damselae* (solo en cepas portadoras de pPHDD1), respectivamente (Tabla IV.5). Esta selectividad de PhlyC dependiente del tipo de eritrocito podría explicarse por diferencias en las composiciones lipídicas de las membranas celulares (Ivanov, 2007). Además, la observación de que el mutante AVL63 es débilmente hemolítico para eritrocitos de trucha, sugiere claramente la existencia de al menos una hemolisina adicional que es activa frente a eritrocitos de trucha, y posiblemente de otras especies de peces.

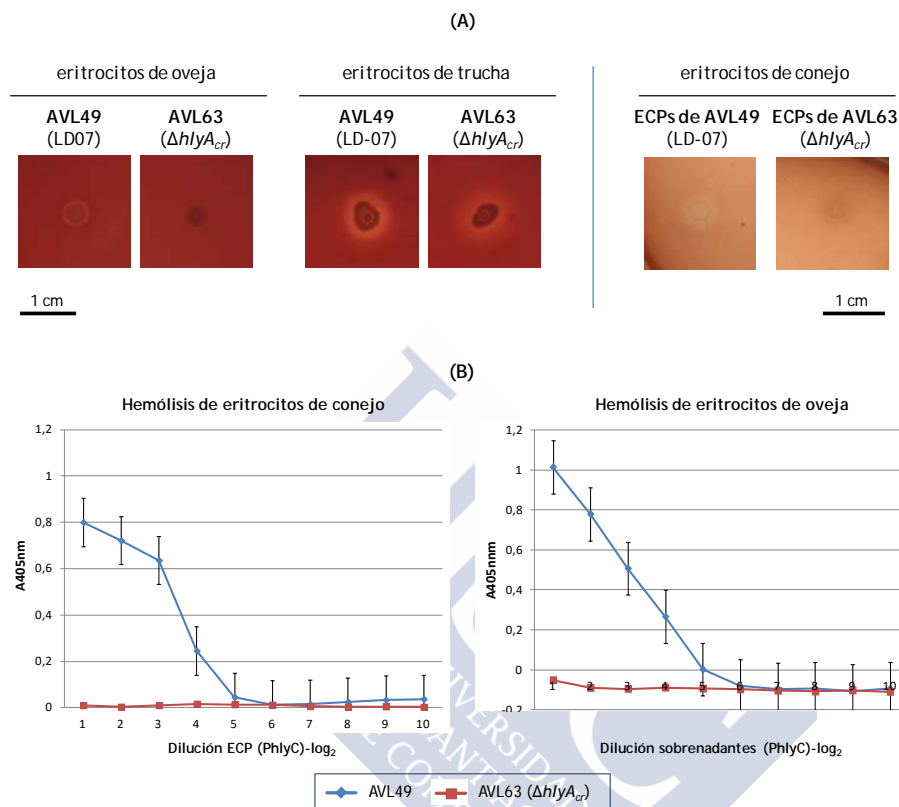


Fig. IV.21: (A) Fenotipos hemolíticos de las cepas parental AVL49 y mutante para $hlyA_{cr}$ (AVL63) de *P. damselae* subsp. *damselae* en placas de agar suplementadas al 5% con sangre de oveja y trucha. Con respecto a los eritrocitos de conejo, la actividad testada es la correspondiente a 5 μ L de los productos extracelulares (ECPs) (3 mg/mL) de las cepas AVL49 y AVL63. Los halos hemolíticos se analizaron después de 24 horas de incubación a 25 °C. La barra de escala representa 1 cm. (B) Actividad hemolítica en presencia de los ECPs/sobrenadantes en eritrocitos de oveja y conejo, respectivamente, de la cepa parental AVL49 y mutante para $hlyA_{cr}$ (AVL63) de *P. damselae* subsp. *damselae*.

Con objeto de confirmar que los fenotipos hemolíticos percibidos se debían exclusivamente a la delección del gen $hlyA_{cr}$ y no a afectos polares u otras causas, procedimos a complementar la cepa mutante con su respectivo alelo salvaje. Para ello, se amplificó por PCR el gen completo $hlyA_{cr}$ y se clonó en el vector pBBR1-MCS5 (Kovach *et al.*,

1995) empleando los cebadores indicados en la Tabla III.7 (sección 3.9 de Material y Métodos). Este plásmido no es un vector de expresión, por lo que al clonar el gen deseado en el sitio de clonaje múltiple es necesario proporcionarle una secuencia promotora. En nuestro caso, decidimos utilizar el propio promotor del gen, lo que nos va a permitir conservar el patrón de expresión natural. Tal y como se señala en la Fig. IV.25B (ver más abajo), la cepa AVL459 obtenida al complementar la cepa mutante AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$) con pAVL449 (vector que contiene el gen *hlyA_{cr}* y su promotor), se restauró el patrón hemolítico mostrado por la cepa parental.

Los datos obtenidos en este apartado nos permiten afirmar que la hemolisina PhlyC es la principal responsable de la hemólisis de eritrocitos de oveja y conejo, así como una de los responsables, en menor medida, de la lisis de eritrocitos de trucha, insinuando claramente la presencia de una hemolisina adicional causante de este fenotipo.



Tabla IV.5: Características de las toxinas formadoras de poro (TFP) homólogas a la hemolisina cromosómica PhlyC de *P. damselae* subsp. *damselae* (Pdd). (PS) péptido señal; (SD) sin datos.

Enzima (Código acceso NCBI)	Especie productora	Características (% Identidad/% cobertura)	Clase y Familia de TFP	Extracelular / Termolabil	Expresada en <i>E. coli</i> / PS predicho	Actividad hemolítica	Virulencia	Referencias
Fobolisina C (PhlyC) (A0J46_02060)	Pdd	1.809 pb - 603 aa 68,14 kDa monómero inmaduro	Clase B, Familia de las hemolisinas HlyA	SI/SI	SI/SI	En sangre de oveja, conejo y trucha	Virulencia en lubina	El presente trabajo
		1.809 pb - 603 aa 68 kDa monómero inmaduro (50 kDa maduro) Estructura pentamérica (250 kDa) (92% id. ; 100% cob.)						
Fobolisina P (PhlyP) (A0J47_15440)	Pdd (codificada en pPHDD1)		Clase B, Familia de las hemolisinas HlyA	SI/SI	SI/SI	En sangre de oveja, ratón y rodaballo	Virulencia en ratón y rodaballo.	Rivas et al. (2011) Rivas et al. (2013b) Rivas et al. (2015a)
Hemolisina VAH1 (CDQ48113.1)	<i>V. anguillarum</i>	2.253 pb - 751 aa 85 kDa monómero inmaduro (50% id. ; 96% cob.)	Clase B, Familia de las hemolisinas HlyA	SI/SD	SI/SI	En sangre de trucha arcoiris, carpa, oveja, conejo, vaca y caballo	Virulencia en salmón	Hirono et al. (1996) Rock & Nelson (2006)
Hemolisina VMH (AL543_02805)	<i>V. mimicus</i>	2.232 pb - 744aa 83 kDa monómero inmaduro (49% id. ; 98% cob.)	Clase B, Familia de las hemolisinas HlyA	SD/SI	SI/SI	En sangre de caballo, oveja y humano	Enterotoxigenidad en conejo	Shinoda et al. (1993) Kim et al. (1997) Miyoshi et al. (1997)
Hemolisina HlyA (WP_004395797.1)	<i>V. nelschinkovii</i>	1.827 pb - 609 aa 68 kDa monómero inmaduro (49% id. ; 98% cob.)	Clase B, Familia de las hemolisinas HlyA	SD/SI	SD/SD	En sangre de ternero, conejo, cerdo, ratón, humano, oveja, pollo y caballo	Aumento de la permeabilidad vascular en la piel de conejos	Miyake et al. (1988)
Hemolisina VFH (AL536_06945)	<i>V. fluvialis</i>	2.200pb - 740 aa 82 kDa monómero inmaduro (79 kDa maduro) (47% id. ; 98% cob.)	Clase B, Familia de las hemolisinas HlyA	SI/SD	SI/SI	En sangre de conejo, oveja, rata, pollo y ratón	Lesiones histopatológicas en el colon de ratones	Han et al. (2002) Song et al. (2015)
Citolisina VCC (VC_A0219)	<i>V. cholerae</i>	2.223 pb - 741aa 82 kDa monómero inmaduro (65 kDa maduro) Estructura heptamérica (450kDa) (48% id. ; 98% cob.)	Clase B, Familia de las hemolisinas HlyA	SI/SD	SI/SI	Alta actividad hemolítica en sangre de conejo, cabra, ratón y oveja. Baja actividad hemolítica en sangre de pollo, caballo y humano	VCC juega un papel en la virulencia in vivo en varios modelos animales (para más detalles ver revisión de Los et al. (2013)	Honda & Finkelstein (1979) Yamanoto et al. (1990a) Figuerola-Arredondo et al. (2001) Moschioni et al. (2002) Olson & Gouaux (2005) De & Olson (2011)

4.3.6. PhlyC es una toxina termolábil, secretada al medio extracelular a través de un sistema de transporte general

Los productos extracelulares son sintetizados por las bacterias patógenas para facilitar la captación de nutrientes del medio circundante, y/o para la invasión exitosa y la supervivencia del patógeno dentro del hospedador (Bakopoulos *et al.*, 2003). Si bien estudios previos han informado acerca de la actividad hemolítica presentada por los productos extracelulares de diversas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* (Fouz *et al.*, 1993; Labella *et al.*, 2010a), el ensayo de actividad hemolítica en sangre de oveja y conejo llevado a cabo en el apartado anterior con los ECPs y sobrenadantes de las cepas AVL49 y AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$), ya nos han confirmado el carácter secretable de la hemolisina PhlyC. Idéntica conclusión obtenemos al analizar la capacidad lítica en una placa de agar sangre de cordero (Oxoid) de los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos de AVL49 y AVL63 (en TSB-1 hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 2) (Fig. IV.22). Estos datos indican que PhlyC es una toxina secretada al medio extracelular, del mismo modo que VFH de *V. fluvialis*, VAH1 de *V. anguillarum*, VCC de *V. cholerae* y PhlyP de *P. damsela* subsp. *damsela* (Tabla IV.5), así como también que no existe otra enzima con actividad hemolítica detectable bajo nuestras condiciones experimentales. Por otro lado, la abolición de la actividad hemolítica tras la incubación de los sobrenadantes de AVL49 durante 10 min a 60 °C, demuestra el carácter termosensible de PhlyC (Fig. IV.22A), al igual que sucede con las hemolisinas homólogas VMH, HlyA, VCC y PhlyP (Tabla IV.5).

Las bacterias gram negativas presentan varios tipos de vías de secreción de proteínas al medio extracelular. Los sistemas de secreción tipo I y II son los más utilizados para la secreción de proteínas recombinantes en la cepa K-12 de *E. coli* (Mergulhão *et al.*, 2005). El proceso de secreción de proteínas extracelulares dependiente del SSTII, es un proceso de dos pasos mediados por translocación periplasmática, en el que el péptido señal de la proteína normalmente se escinde durante la secreción a través de la membrana citoplasmática (Mergulhão *et al.*, 2005). El análisis de la capacidad hemolítica de la

cepa S17-1- λ pir de *E. coli* portadora de pAVL449 (pBBR1-MCS5+*hlyA_{cr}*) obtenida en la sección anterior, demuestra que la incorporación del gen *hlyA_{cr}* le aporta a la cepa de *E. coli* (no hemolítica) la capacidad de lisar eritrocitos de oveja (Fig. IV.25A). Estos resultados sugieren que PhlyC debería ser secretada a través de un sistema de transporte general conservado entre especies. Por otro lado, la predicción de la existencia de un péptido señal en PhlyC través del servidor SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011), ha revelado la presencia de un péptido señal de 23 aminoácidos (MKIRKLYSCILLGLSSLSASAIA), lo cual insinúa que PhlyC podría ser secretada al medio extracelular a través de un sistema de secreción dependiente del mecanismo Sec (Thanassi *et al.*, 2005), como podría ser el SSTII. Al igual que la fobalisina C, sus homólogas VMH de *V. mimicus*, VAH1 de *V. anguillarum*, VFH de *V. fluvialis*, VCC de *V. cholerae* y PhlyP de *P. damsela* subsp. *damsela*, también se expresaron en *E. coli* y también se han considerado como enzimas secretadas al medio extracelular con predicción de péptido señal (Tabla IV.5). En el capítulo 4.8 de Resultados y Discusión abordaremos la cuestión de su secreción.

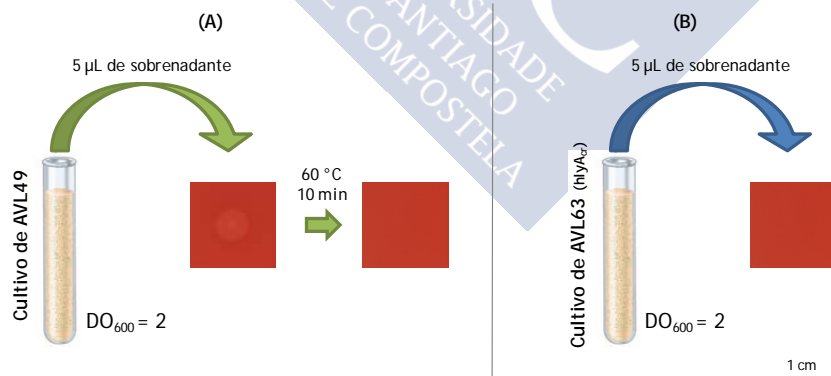


Fig. IV.22: Actividades hemolíticas de los sobrenadantes de la cepa parental AVL49 (A) y posterior inactivación tras incubación durante 10 min a 60 °C; y de la cepa mutante AVL63 (B). Fenotipo testado en placas de agar sangre de cordero (Oxoid) tras 24 horas de incubación a 25 °C. La barra de escala representa 1 cm.

4.3.7. PhlyC contribuye a la virulencia de LD-07 (≠ pPHDD1) en lubina

Se puede decir que las hemolisinas son las exotoxinas más ampliamente distribuidas entre los *Vibrio* spp. patógenos, existiendo numerosas evidencias epidemiológicas y experimentales que indican su implicación en la patogénesis (Sun *et al.*, 2007). Tal y como se ha mencionado anteriormente, las toxinas formadoras de poro (TFP) constituyen un grupo de factores de virulencia bacterianos que desempeñan un papel importante en diversas patologías, muchas de ellas de gran interés en clínica humana. Estas enzimas horadan las membranas de las células diana, hecho que contribuye a la interrupción de la respuesta inmune de hospedador y ayuda a atravesar las barreras epiteliales y endoteliales, favoreciendo la colonización e invasión bacterianas, aunque su contribución precisa es difícil de establecer (Los & Ratner, 2014). Las TFP pueden contribuir a la disrupción del sistema inmune del hospedador mediante (i) la prevención al ataque de células del sistema inmune, (ii) lisis directa o inducida por muerte celular programada, (iii) ayudar a la invasión bacteriana de las células del hospedador y supervivencia intracelular, y (iv) secuestrar moléculas del hospedador pertenecientes a rutas de defensa (Los *et al.*, 2013). Muchos son los ejemplos de TFP de diversas especies bacterianas relacionadas con la virulencia: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, entre otras (Los *et al.*, 2013).

Como ya se ha apuntado al comienzo de ese capítulo, hasta la fecha, el papel de la toxina formadora de poro PhlyC en la virulencia en peces se ha evaluado exclusivamente en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* portadoras de pPHDD1, y empleando como modelo animal el rodaballo, estudio que constató la importancia de PhlyC en la virulencia de este tipo de cepas (Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013b). No obstante, la mayoría de las cepas aisladas de brotes en piscifactorías de los últimos años no producen ni Dly ni PhlyP, y además, se han recuperado principalmente de peces espáridos y de lubinas (Labella *et al.*, 2010a; Terceti *et al.*, 2016; Rivas *et al.*, 2014).

Por ello, decidimos estudiar la contribución del gen *hlyA_{cr}*, y por lo tanto de su producto, la fobalisina C (PhlyC), en la virulencia de cepas carentes de pPHDD1 empleando como modelo animal la lubina.

Una vez establecida la relación entre capacidad hemolítica y *hlyA_{cr}*, el siguiente paso a seguir fue el de analizar la posible contribución de la fobalisina C a la virulencia en lubina del mutante AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$), con respecto a la cepa parental AVL49 de *P. damselae* subsp. *damselae* (sección 3.13 de Material y Métodos). Es necesario resaltar que los peces fueron aclimatados en tanques de 100 litros a 24 °C durante una semana antes de realizar el desafío, manteniendo esta temperatura durante todo el experimento. Las pruebas de virulencia se llevaron a cabo por vía intraperitoneal de suspensiones bacterianas en solución salina al 0,85%, empleando una dosis de $2,5 \times 10^6$ UFC/pez e infectando un total de 10 lubinas por cepa a ensayar. Además, la mortalidad de los peces se registró diariamente durante 8 días post-inoculación, sembrando en TSA-1 y TCBS los riñones de peces muertos y confirmando las colonias obtenidas mediante la amplificación del gen *ureC* (Osorio *et al.*, 2000b).

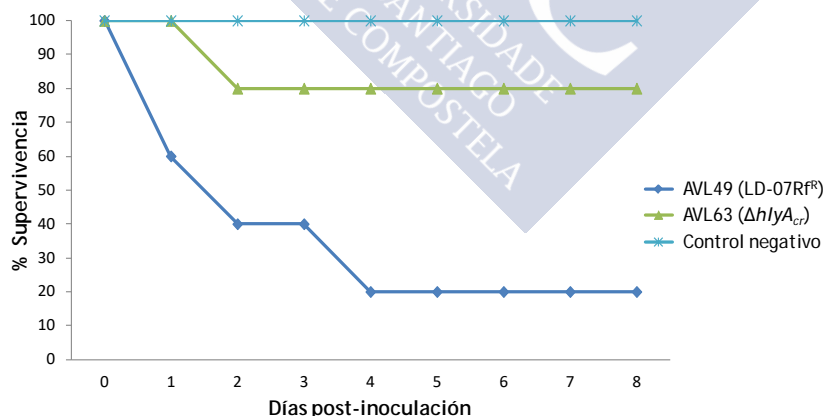


Fig. IV.23: Supervivencia (%) de lubinas tras inoculación intraperitoneal ($2,5 \times 10^6$ UFC/pez) de la cepa de *P. damselae* subsp. *damselae* AVL49 (LD-07Rf^R) y mutante AVL63 para el gen *hlyA_{cr}* de la hemolisina PhlyC codificada en el cromosoma ($n=10$ peces por cepa). Empleamos como control peces inyectados con solución salina ($n=10$ peces por cepa).

Después de ocho días transcurridos tras el desafío con las diferentes cepas, pudimos observar como la cepa salvaje AVL49 mataba al 80% de las lubinas infectadas (Fig. IV.23). Por su parte, los valores de supervivencia registrados en el caso del mutante simple AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$) mostraron un aumento de los mismos, alcanzando el 80% de peces supervivientes (Fig. IV.23). A la luz de los resultados obtenidos, podemos confirmar que la toxina formadora de poro PhlyC es el principal contribuyente a la virulencia en lubina de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* carentes del plásmido pPHDD1, pero dado que el mutante para *hlyA_{cr}* todavía exhibe un cierto grado de virulencia, no podemos descartar la presencia de factores de virulencia adicionales en este tipo de aislados. Este resultado concuerda con los datos presentados por Terceti *et al.* (2016), en los que han demostrado que cepas con el gen *hlyA_{cr}* afuncional presentaban un cierto grado de virulencia en lubina. Del mismo modo, las hemolisinas PhlyC y PhlyP contribuyen junto con Dly, a la virulencia en rodaballo y ratón en cepas portadoras de pPHDD1 (Rivas *et al.*, 2013b; Rivas *et al.*, 2014). Igualmente, en otras hemolisinas homólogas a PhlyC se ha demostrado su contribución a la patogenicidad, tales como la citolisina VCC de *Vibrio cholerae*, VAH1 de *V. anguillarum*, VFH de *V. fluvialis* o HlyA de *V. metschnikovii*, entre otras (Tabla IV.5).

Si bien no hemos llevado a cabo análisis destinados a comprender mejor la acción directa *in vivo* de PhlyC sobre el hospedador, Rivas *et al.* (2015a) descubrieron que en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* portadoras de pPHDD1, las toxinas PhlyC, PhlyP y Dly, aumentaban la adherencia bacteriana a las células eucariotas, hecho que puede ser de gran importancia en los eventos tempranos de la infección natural. Además el daño tisular causado por las hemolisinas puede proporcionar una fuente de nutrientes para apoyar aún más la infección bacteriana.

En resumen, aunque estudios previos informaron que las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* sin pPHDD1 muestran virulencia para una variedad de especies de peces (Terceti *et al.*, 2016; Pedersen *et al.*, 2009), nuestro estudio constituye una evidencia clara de que *hlyA_{cr}* (el gen que codifica PhlyC) es un contribuyente principal a la virulencia de cepas sin plásmido. Además, podemos afirmar que la

capacidad virulenta de la cepa AVL49 (\nexists pPHDD1) no reside únicamente en la acción de la fobalisina PhlyC, dejando una puerta abierta a la búsqueda de nuevos factores de virulencia en cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1.

4.3.8. Las fobalisinas cromosómicas PhlyC de LD-07 (\nexists pPHDD1) y RM-71 (\exists pPHDD1) presentan actividades hemolíticas similares en sangre de oveja

Habíamos comenzado el recorrido de la presente tesis comparando la virulencia y citotoxicidad de la cepa mutante para *dly* y *hlyA_{pl}* AR78 (\exists pPHDD1), con las de la cepa carente de pPHDD1 AVL49, y obteniendo como resultado una mayor virulencia y citotoxicidad de la cepa portadora del plásmido, a pesar de no ser capaz de sintetizar los factores de virulencia Dly y PhlyP. Surgía así el interrogante de si la hemolisina PhlyC de la cepa RM-71 era más citotóxica que su homóloga PhlyC de la cepa LD-07, lo que podría explicar la mayor virulencia del mutante AR78. Con el fin de esclarecer, al menos en parte, esta duda, comparamos las actividades hemolíticas de las cepas AVL49 y AR78 en placas de agar sangre de oveja, así como en sangre líquida de conejo y oveja. Para ello, obtuvimos los productos extracelulares (3 mg/mL) y los sobrenadantes (cultivos DO₆₀₀=2) de las cepas AVL49 y AR78, ambas capaces solo de sintetizar la hemolisina PhlyC. Tal y como podemos observar en la Fig. IV.24A, a concentraciones altas de proteína total (PhlyC), ambas fobalisinas presentan actividades hemolíticas semejantes, tanto en sangre de conejo como de oveja. Del mismo modo, los halos hemolíticos en placas de TSA-1 suplementadas con 5% de sangre de oveja muestran diámetros similares tras 24 horas de incubación (Fig. IV.25B). Curiosamente, en los ensayos en líquido en eritrocitos de oveja, a medida que la concentración proteica disminuye, la acción hemolítica de PhlyC de AR78 parece ser mayor que la causada por PhlyC de AVL49 (Fig. IV.24A). Tal vez en las primeras diluciones no detectamos la desemejanza en sangre de oveja porque hay exceso de PhlyC en los dos casos. Por el contrario, no sucede lo mismo en el ensayo en líquido en sangre de conejo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

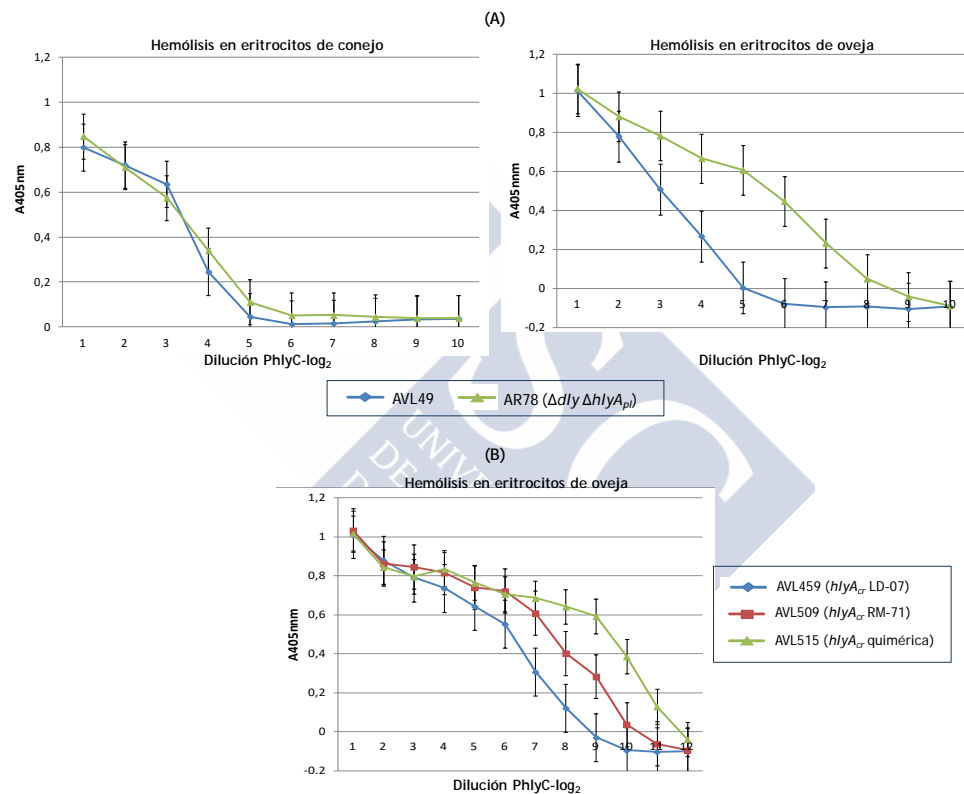


Fig. IV.24: (A) Actividades hemolíticas de los productos extracelulares y sobrenadantes de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* AVL49 y AR78 en eritrocitos de conejo y oveja. (B) Actividades hemolíticas de los sobrenadantes de la cepa mutante AVL63 para $hlyA_{cr}$ complementada con las fobalisinas PhlyC de LD-07 (AVL459) y de RM-71 (AVL509), y la fobalisina quimérica (AVL515).

Ante estos resultados, planteamos dos hipótesis: i) PhlyC de AR78 es más hemolítica en sangre de oveja que PhlyC de AVL49; y/o ii) la expresión de PhlyC es mayor en la cepa portadora de pPHDD1 que en la cepa AVL49, tal vez por la acción de un elemento regulador codificado en el plásmido. Con la finalidad de estudiar la primera de las hipótesis, llevamos a cabo una comparación de las secuencias aminoacídicas de las fobalisinas cromosómicas de la cepa LD-07 (PhlyC-LD-07), y de RM-71 (PhlyC-RM-71). En segundo lugar, procedimos a realizar un estudio de sus actividades hemolíticas tras su clonación en *E. coli* S17-1- λ pir, así como en los mutantes no hemolíticos AR89 (RM-71R^R Δ dly Δ hlyA_{pl} Δ hlyA_{cr}) y AVL63 (LD-07R^R Δ hlyA_{cr}). Concretamente, en estos mutantes introduciremos no solo el gen *hlyA_{cr}* correspondiente a la cepa, sino que también los complementaremos con el gen *hlyA_{cr}* de la cepa contraria (ver sección 3.9 de Material y Métodos).

El alineamiento aminoacídico de las fobalisinas cromosómicas de las cepas PhlyC de RM-71 (A0J47_02585) y LD-07 (A0J46_0260), reveló un total de 8 diferencias distribuidas a lo largo de la proteína. De estos cambios hallados, los dos localizados en el pro-dominio son conservativos, mientras que los seis restantes distribuidos en los dominios citolítico y lectina no son conservativos (Tabla IV.6). Estas variaciones en PhlyC de la cepa LD-07, podrían verse reflejadas en una menor capacidad hemolítica, especialmente aquellas que afectan al dominio citolítico y al dominio lectina. Aunque por otro lado, también debemos destacar que ninguna de ellas ocupa las posiciones consideradas como relevantes analizadas durante el apartado 3.4 del presente capítulo. Además, si tenemos en cuenta las secuencias de VCC de *V. cholerae* y PhlyP de *P. damsela* subsp. *damsela*, estas posiciones también han resultado ser variables (Fig. IV.19C).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla IV.6: Residuos aminoacídicos que difieren en las hemolisinas cromosómicas de la cepa portadora de plásmido RM-71, y la cepa carente del mismo, LD-07. Se indica la posición, el carácter químico y la posición de los aminoácidos.

PhlyC de RM-71 (A0J47_02585)	PhlyC de LD-07 (A0J46_02060)
Pro-dominio	
Histidina ₆₂ (básido apolar)	Arginina ₆₂ (básido apolar)
Ácido glutámico ₈₇ (ácido polar)	Aspartato ₈₇ (ácido polar)
Dominio citolítico	
Glicina ₁₁₀ (neutro apolar)	Serina ₁₁₀ (neutro polar)
Glicina ₁₉₁ (neutro apolar)	Arginina ₁₉₁ (básico apolar)
Lisina ₂₈₄ (básico apolar)	Ácido glutámico ₂₈₄ (ácido polar)
Dominio lectina	
Arginina ₅₅₉ (básico apolar)	Isoleucina ₅₅₉ (neutro apolar)
Asparagina ₂₇₃ (neutro polar)	Serina ₂₇₃ (ácido polar)
Lisina ₅₈₄ (básico apolar)	Asparagina ₅₈₄ (neutro polar)

A continuación, examinamos la actividad hemolítica de la cepa S17-1- λ pir de *Escherichia coli* tras su complementación con los genes *hlyA_{cr}* de ambas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*. Para ello, amplificamos mediante PCR los genes *hlyA_{cr}* junto con sus secuencias promotoras, de la cepa RM-71 y LD-07. Empleando los cebadores indicados en la Tabla III.7 de Material y Métodos. La clonación de los insertos se llevó a cabo en el plásmido pBBR1-MCS5, obteniendo como resultado los plásmidos pAVL500 (pBBR1-MCS5+ *hlyA_{cr}*-RM-71) y pAVL449 (pBBR1-MCS5+ *hlyA_{cr}*-LD-07). El estudio de las actividades hemolíticas de estas cepas en placas de TSA-1 suplementadas con 5% de sangre de oveja, desveló halos hemolíticos equiparables (Fig. IV.25A). Este resultado revela que, a pesar de las diferencias aminoacídicas entre las dos enzimas, ambas exhiben los mismos fenotipos hemolíticos, al menos en agar sangre de oveja y en el contexto genético de *E. coli*. El siguiente paso a seguir, fue el de analizar el halo hemolítico de los mutantes AR89 (Δ *dly* Δ *hlyApl* Δ *hlyA_{cr}*) y AVL63 (Δ *hlyA_{cr}*) tras la complementación con sus

respectivos genes *hlyA_{cr}*, así como con el gen *hlyA_{cr}* de la cepa contraria, obteniendo las cepas indicadas en la Fig. IV.25B. De este modo, observamos que la hemólisis de la cepa AVL63 portadora de *hlyA_{cr}*-LD-07 (AVL459) y *hlyA_{cr}*-RM-71 (AVL509) son equiparables. Lo mismo sucede cuando complementamos el triple mutante AR89 con su propio gen *hlyA_{cr}* (AVL453), y con el gen de la cepa AVL49 (AVL477) (Fig. IV.25B). En conjunto, estos datos no sugieren una diferencia significativa en las actividades hemolíticas de las fobalisinas cromosómicas de las cepas AVL49 y AR78, en placas de agar sangre de oveja tras 24 horas de incubación.

En contraposición, al estudiar la hemólisis en líquido en sangre de oveja de las cepas AVL459 y AVL509 (cepa AVL63 complementada con su propia PhlyC y con la de RM-71, respectivamente) nos topamos con unas ligeras diferencias solo perceptibles en diluciones mayores de sus sobrenadantes (Fig. IV.24B). Es decir, a menores concentraciones de PhlyC en el medio extracelular, PhlyC de RM-71 ocasiona un poco más de daño a los eritrocitos de oveja que PhlyC de LD-07, en el mismo contexto genético. Desde nuestro punto de vista, estas pequeñas diferencias de actividad entre las dos fobalisinas cromosómicas no explicarían los valores hemolíticos en sangre de oveja observados en la Fig. IV.24A, por lo que la hipótesis de una mayor expresión de PhlyC de RM-71 por la participación de un regulador plasmídico cobraría más peso.

Dado que los estudios llevados a cabo por Rivas *et al.* (2014) propusieron que cambios aminoacídicos en el dominio lectina, podrían resultar en un cambio en las actividades de las hemolisinas PhlyC y PhlyP de la cepa RM-71, decidimos analizar si los cambios aminoacídicos presentes en este dominio encargado del reconocimiento de carbohidratos, afectaban a la actividad hemolítica de la fobalisina C. Para ello, mediante la técnica PCR-SOE (sección 3.3 de Material y Métodos), construimos una PhlyC quimérica clonada en pBBR5-MSCl (pAVL498). Esta proteína quimérica se obtuvo tras intercambiar en PhlyC de LD-07 la sección del dominio lectina diferente, con la correspondiente a la fobalisina C de RM-71 (Fig. III.1 de Material y Métodos). Tal y como se observa en la Fig. IV.25A, el halo hemolítico en placas de agar sangre de oveja de la

PhlyC quimérica expresada en *E. coli*, es comparable al de las fobalisinas originales clonadas en esta especie. De igual manera, al complementar los mutantes no hemolíticos AVL63 y AR89 con la fobalisina quimérica, no encontramos diferencias con relación a los fenotipos hemolíticos (Fig. IV.25B). Por el contrario, al estudiar la hemólisis líquida en eritrocitos de oveja de la cepa mutante para *hlyA_{cr}* AVL63 complementada con la fobalisina quimérica (AVL515), pequeñas diferencias salieron a la luz. Al igual que en los ensayos en líquido anteriores, en las primeras diluciones no encontramos diferencias en sus actividades hemolíticas, siendo perceptible una mayor actividad de PhlyC-quimérica a diluciones mayores (Fig. IV.24B).

Si bien las diferencias en las actividades hemolíticas de las fobalisinas cromosómicas entre una cepa portadora de pPHDD1 y una cepa carente del mismo han señalado una pequeña pero mayor actividad por parte de la primera de ellas en un mismo contexto genético, los resultados no son concluyentes para poder afirmar categóricamente que el valor hemolítico observado en AR78 sea debido únicamente a una mayor acción de esta hemolisina, y no por una mayor expresión de la misma. Para poder solventar todas estas dudas, sería necesario realizar en un futuro ensayos de expresión o también analizar las actividades hemolíticas de las fobalisinas cromosómicas purificadas.

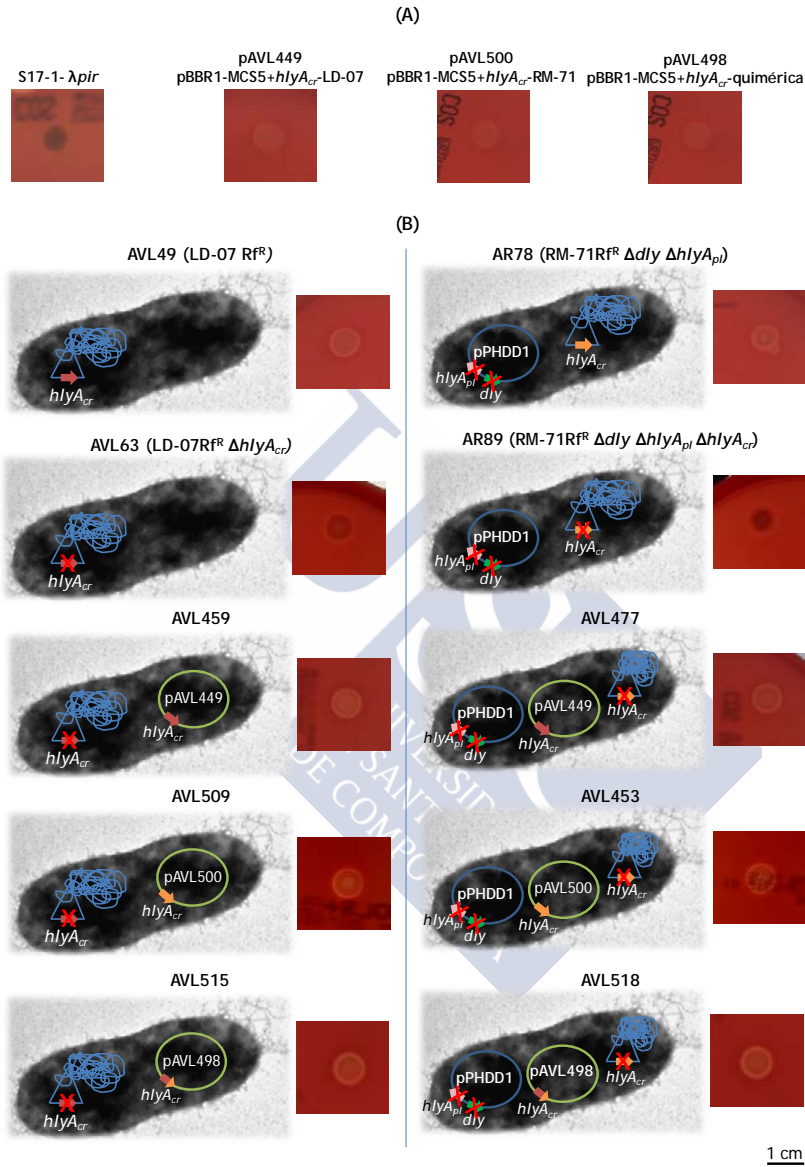


Fig. IV.25: (A). Actividad hemolítica de la cepa S17-1- λ pir de *Escherichia coli* con hlyA_{cr} de LD-07 (pAVL449) y hlyA_{cr} de RM-71 (pAVL500), clonadas en el plásmido pBBR1-MCS5. (B) Actividades hemolíticas de las cepas mutantes de *P. damsela* subsp. *damsela* indicadas. El ensayo se realizó depositando sobre placas de sangre de cordero (Oxoid) un volumen de 5 μ L de cultivos con DO₆₀₀=1. Analizamos los halos hemolíticos tras 24 horas de incubación a 25 °C. La barra de escala representa 1 cm.

4.4. IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA PLP_V Y SU CONTRIBUCIÓN A LA VIRULENCIA EN *P. DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE*

Tal y como acabamos de constatar en la sección 4.3 de Resultados y Discusión, el mutante $\Delta hlyA_{cr}$ de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* todavía muestra un cierto grado de virulencia en lubina, así como actividad hemolítica contra eritrocitos de trucha. Además de estas observaciones, el hecho de que cepas carentes del plásmido virulento y con pérdida funcional del gen *hlyA_{cr}* (inactivación por elementos de inserción de forma natural) han mostrado un cierto grado de virulencia en lubina (Terceti *et al.*, 2016), nos induce a seguir indagando en la búsqueda de factores de virulencia adicionales en la cepa AVL49.

Numerosos estudios previos han informado acerca de la actividad fosfolipasa de *P. damsela* subsp. *damsela* (Fouz *et al.*, 1993; Labella *et al.*, 2010a; Labella *et al.*, 2011; Khouadja *et al.* 2014). Si bien algunos trabajos apuntan a la damselisina Dly (fosfolipasa D) como la causante de la actividad fosfolipasa exhibida por las cepas portadoras de pPHHD1, realmente hasta el momento no se dispone de ninguna evidencia experimental que demuestre que dicha actividad se deba a la damselisina. Además, actualmente se desconoce cuál es la enzima responsable de la capacidad de hidrolizar fosfolípidos mostrada por las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1 (y por lo tanto de Dly), así como su posible participación en el carácter virulento que muestran estas últimas (Fouz *et al.*, 1993; Terceti *et al.*, 2016). Por otra parte, varios trabajos centrados en patógenos gram negativos (incluidos *Vibrio* spp.), relacionan la enzima fosfolipasa con el potencial virulento (Istivan & Coloe, 2006; Lee *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2006; Koo *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2017). Teniendo presente esta información, decidimos iniciar un estudio pormenorizado de la actividad fosfolipasa en cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1, con la finalidad de localizar el gen responsable y estudiar su posible implicación en la virulencia de este tipo de cepas.

4.4.1. Todos los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* presentan actividad fosfolipasa

Estableciendo como objetivo el hallazgo de la base genética de la degradación de fosfolípidos extracelulares en *P. damsela* subsp. *damsela*, se procedió en primer lugar a la exploración de dicha actividad en un total de 49 aislados disponibles en el cepario del laboratorio. La detección de la actividad fosfolipasa se realizó mediante el crecimiento en placas de TSA-1 suplementadas con 3% de emulsión de yema de huevo comercial (Oxoid), y posterior incubación durante 24 horas a 25 °C (sección 3.12.2.2 de Material y Métodos). La yema de huevo se caracteriza por portar gran cantidad del fosfolípido fosfatidilcolina, comúnmente conocido como lecitina. La cepa será positiva para este carácter cuando muestre un halo opaco a su alrededor.

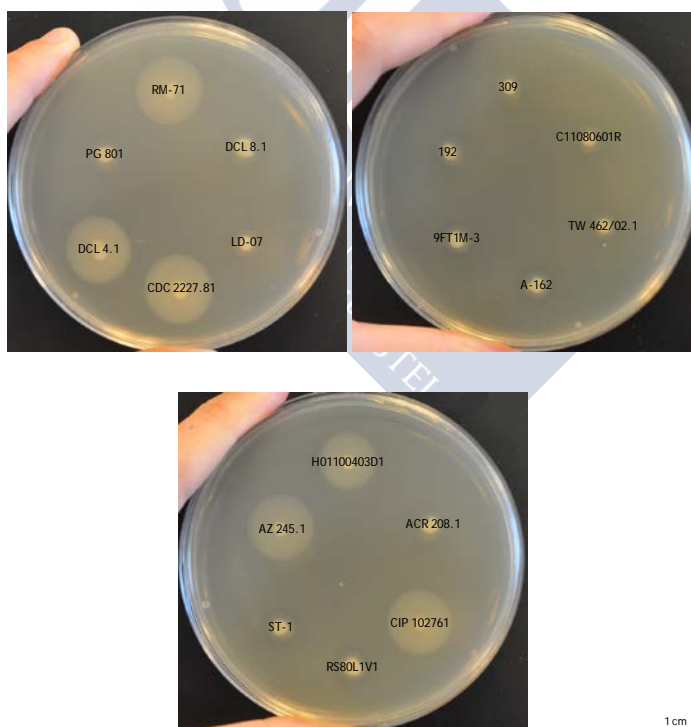


Fig. IV.26: Actividades fosfolipasas de diversas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* detectadas en placas de TSA-1 suplementadas con 3% con extracto de yema de huevo, tras 24 horas de incubación a 25 °C.

Así, como podemos observar en la Tabla IV.4, todos los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* analizados presentaron halos de precipitación opaca en las placas de yema de huevo. Este resultado nos señala claramente que todas las cepas son capaces de hidrolizar los fosfolípidos aportados al medio, independientemente de si son productoras de la fosfolipasa D damselsina, es decir, portadoras de pPHDD1. Confirmando nuestros datos, el 100% de los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* procedentes de peces cultivados analizados por Labella *et al.* (2010a) y Fouz *et al.* (1993), así como el 66% de las cepas analizadas por Khouadja *et al.* (2014), mostraron actividad fosfolipasa. Por el contrario, el 34% de cepas aisladas de doradas y lubinas analizadas por Khouadja *et al.* (2014) y dos aislados de tiburón (Grimes *et al.*, 1984a, Grimes *et al.*, 1984b), no exhibieron tal capacidad.

Si bien es cierto que la totalidad de los aislados estudiados hidrolizan fosfolípidos, no todos lo hacen con el mismo grado. Las cepas que producen Dly muestran un halo de precipitación 5 veces más amplio que el de las cepas carentes de la misma (Fig. IV.26; Tabla IV.4). Esta diferencia de actividad enzimática también se puede observar en el estudio de Fouz *et al.* (1993), en el que los productos extracelulares de 9 cepas analizadas también presentaban actividades fosfolipasa diferenciales, llegando a presentar los mayores valores aquellas cepas que actualmente sabemos que portan pPHDD1 (por ejemplo: RM-71, RG-91, CDC2227-81) (Rivas *et al.*, 2011). En conjunto, estos datos nos sugieren que las cepas de esta subespecie codifican en su genoma una enzima con actividad fosfolipasa diferente a Dly.

Con la finalidad de averiguar si en las cepas productoras de damselsina (portadoras de pPHDD1), la actividad fosfolipasa detectada se debía a la acción única de Dly, o era el resultado de la actuación en conjunto con otra fosfolipasa, se evaluó esta capacidad enzimática en la cepa AR64, mutante para Δdly (Fig. IV.27). El resultado mostró una fuerte disminución del halo de precipitado en la cepa mutante, llegando a producir un halo similar al de la cepa sin plásmido AVL49 (Fig. IV.27). Estos datos evidencian notoriamente que la actividad fosfolipasa de AR57 no se debe exclusivamente a la

presencia de Dly, sino también a la existencia de una fosfolipasa adicional. Además, nos orientan a considerar a esta fosfolipasa adicional como la responsable de la hidrólisis de fosfolípidos observada en todas las cepas sin plásmido, pudiendo estar codificada por uno de los cromosomas de *P. damselae* subsp. *damselae*.

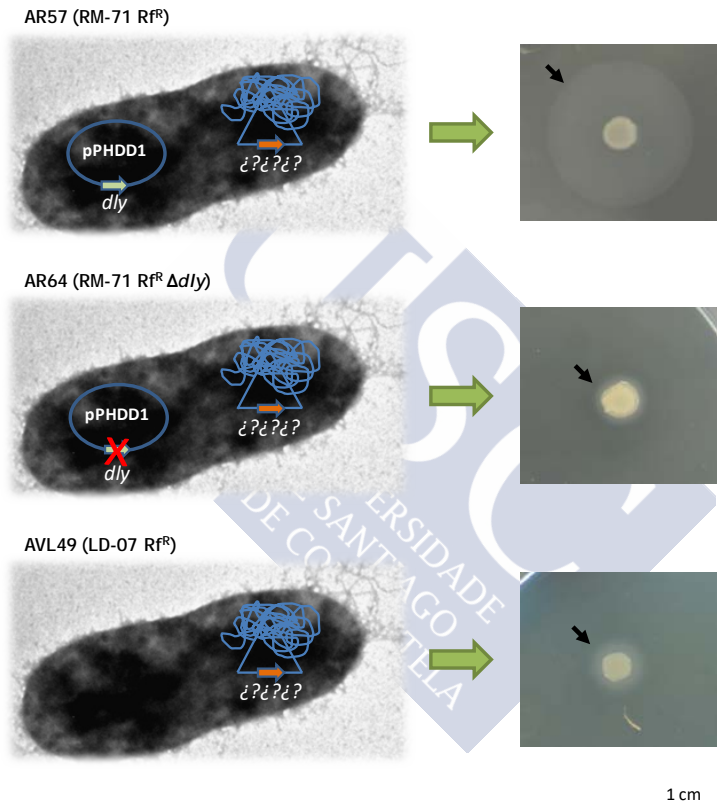


Fig. IV.27: Contextos genéticos y actividades fosfolipasas de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* AR57 (portadora de pPHDD1), del mutante derivado para el gen *dly* (AR64) y de la cepa sin plásmido AVL49, detectadas en placas de TSA-1 con yema de huevo al 3%.

4.4.2. Todas las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* producen una fosfolipasa PlpV codificada en el cromosoma I

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior, el segundo paso a seguir fue el de iniciar una búsqueda *in silico* en los cuatro genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* disponibles (CIP 102761, RM-71, LD-07 y A-162), con el objetivo de localizar un gen candidato a codificar una fosfolipasa. La pesquisa se realizó tomando dos vías diferentes, por un lado, mediante una búsqueda visual en los genes anotados de la cepa tipo CIP 102761, y por otro lado, realizando un BLASTP tomando como posible enzima homóloga la fosfolipasa BAB85814 descrita en *P. damsela* subsp. *piscicida* (Hsu *et al.*, 2013). Como fruto de estos análisis, se identificó en el cromosoma I de la cepa tipo CIP 102761 una posible fosfolipasa anotada con el código VDA_002242, gen al que denominaremos de ahora en adelante bajo el acrónimo *plpV* (*phospholipase of Vibrionaceae*) (Fig. IV.28A). Esta ORF muestra una identidad del 98% y 100% de cobertura con respecto a BAB85814 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, y además, está presente en los cuatro genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* analizados (Fig. IV.28B).

Al analizar el entorno del gen *plpV* en la cepa tipo CIP 102761, lo localizamos flanqueado por los genes de una proteína 2-oxoglutarato (VDA_002241), perteneciente al complejo piruvato deshidrogenasa, y de una proteína de función desconocida (VDA_002243) (Fig. IV.28A). Cabe destacar en la Fig. IV.28B, que la anotación de las ORFs establecida por el servidor RAST localizó en todos los genomas una proteína, a la que denomina ACR, adyacente a *plpV*, que no está presente en la anotación llevada a cabo por NCBI (Tatusova *et al.*, 2013), por lo que esta ORF no tiene código proteico para esta base de datos. De todos modos, la comparación de los contextos genéticos de *plpV* en el resto de los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* reveló la misma ubicación en todos ellos (Fig. IV.28B).

Con la intención de estudiar la distribución de *plpV* en todas las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* disponibles en el cepario, llevamos a cabo una amplificación del gen *plpV* juntos con regiones adyacentes. Para ello diseñamos sobre el genoma de la cepa tipo CIP

102761 los cebadores *plpV_int_F* y *plpV_int_R*, cuyo tamaño de amplificación esperado es de 1.618 pb (Tabla III.4 de Material y Métodos) (Fig. IV.28A). Los datos obtenidos revelaron la presencia de *plpV* en todas las cepas, exponiendo un carácter ubicuo en la subespecie *damselae* (Fig. IV.28C; Tabla IV.4). Este resultado también nos indica que en todas las cepas disponibles en el cepario, *plpV* se localizaba en la misma región del cromosoma I.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

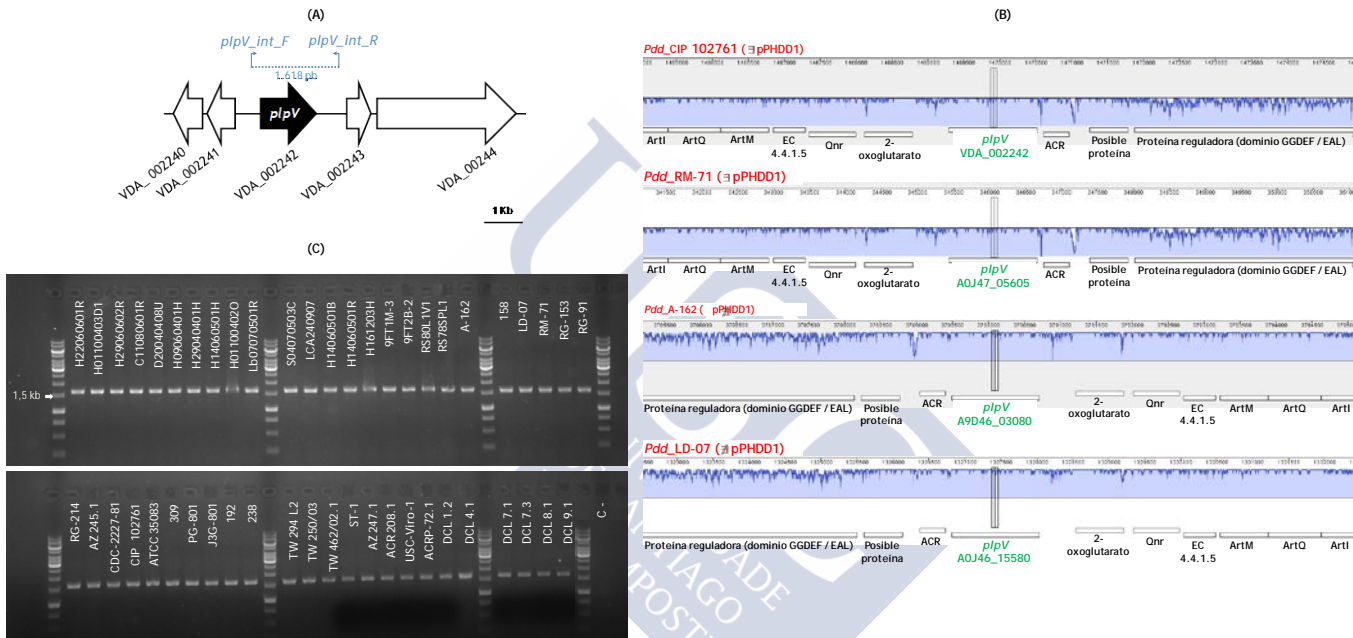


Fig. IV.28: (A) Contexto genético del gen de la posible fosfolipasa PlpV (VDA_002242) en el cromosoma I de la cepa tipo *P. damsela* subsp. *damsela* CIP 102761. (B) Comparación del entorno genético de *plpV* y sus homólogos presentes en los genomas de RM-71, LD-07 y A-162, mediante el software MAUVE (Darling *et al.*, 2010). (C) Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR obtenidos tras amplificar 49 cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* con los cebadores *plpV_int_F* y *plpV_int_R*. Se indica la banda de peso molecular correspondiente a 1,5 Kb (0´GeneRuler).

4.4.3. PlpV muestra homología con fosfolipasas de la familia *Vibrionaceae*, entre otras

A lo largo de las últimas décadas, numerosas han sido las fosfolipasa descritas, tanto en la familia *Vibrionaceae* como en otras, siendo muchas de ellas de gran interés patogénico (Schmiel & Miller, 1999; Tabla IV.7). Como era de esperar, la búsqueda de enzimas homólogas a PlpV mediante el servidor BLASTP, manifestó su similitud con diversas fosfolipasas o hemolisinas termolábiles producidas por especies de la familia *Vibrionaceae*: la fosfolipasa PPP de *P. damsela* subsp. *piscicida* (98% identidad, 100% cobertura), una fosfolipasa de *P. profundum* (64%, 96%), hemolisinas termolábiles de *P. ganghwense* (66%; 92%), *P. sanguinicancri* (67%; 93%), *P. swingsii* (62%; 100%) y de *V. alginolyticus* (61%, 92%); una fosfolipasa de *V. anguillarum* (57%, 98%), una fosfolipasa/hemolisina de *V. vulnificus* (57%, 100%), una hemolisina de *V. harveyi* (57%, 92%), una hemolisina dependiente de lecitina (LDH) de *V. parahaemolyticus* (55%, 94%) y las lecitinasas de *V. mimicus* (55%, 99%) y *V. cholerae* (53%, 100%), entre otras. También se han hallado homólogos en especies bacterianas de otras familias tales como: las aciltransferasas de *Aeromonas salmonicida* (24% identidad; 73% cobertura) y *A. hydrophila* (27% de; 67%) o la lisofosfolipasa A (PlaA) de *Legionella pneumophila* (29%; 70%) y el efector secretado SseJ de *Salmonella enterica* (29%; 67%).

Para comprender mejor la distribución de este tipo de enzimas, se realizó un análisis filogenético empleando el método Neighbor-Joining (1000 bootstraps) con los homólogos proteicos aportados por BLASTP, y estableciendo como raíz la fosfolipasa de *Burkholderia pseudomallei*. El árbol Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), construido a partir de las secuencias proteicas de enzimas homólogas a PlpV, tiene un fuerte patrón de ramificación basal. *A priori*, podemos distinguir dos grandes ramificaciones con soportes estadísticos elevados (bootstraps = 98): la rama de color verde que corresponde a las enzimas homólogas en la familia *Vibrionaceae* (en donde se incluye PlpV) y la rama naranja, más profunda debido a un mayor número de sustituciones aminoacídicas, que hace referencia a las enzimas homólogas en otras familias bacterianas (Fig. IV.29). Aunque

la fosfolipasa PlpV se agrupa junto con un grupo de enzimas claramente ortólogas de especies pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, en este agrupamiento divisamos enzimas con actividades diferentes tales como hemolisinas, lecitinasas y fosfolipasas (Fig. IV.29). Este agrupamiento no es de extrañar, ya que muchas fosfolipasas/lecitinasas presentan de manera adicional otras capacidades enzimáticas (Akoh *et al.*, 2004), tal y como comentaremos en secciones posteriores. Al centrarnos exclusivamente en la rama perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, destaca la separación de homólogos de *Vibrio* spp. y *Photobacterium* spp. en dos ramas internas con valores de bootstrap de 65 y 95, respectivamente (Fig. IV.29).

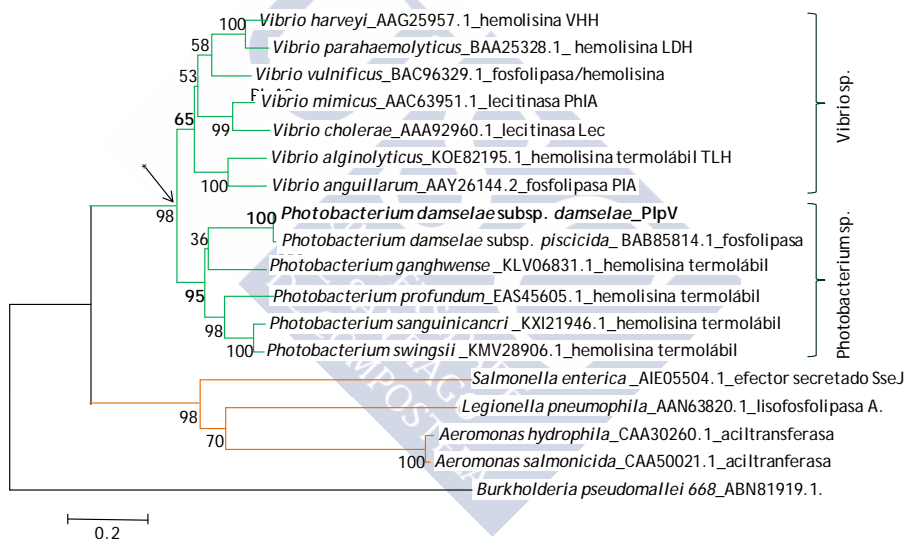


Fig. IV.29: Comparación de secuencias de aminoácidos que representa la relación filogenética de la fosfolipasa PlpV con enzimas relacionadas. El árbol filogenético se construyó empleando el método Neighbor-joining (1000 bootstraps) empleando el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Los valores de bootstrap están indicados en cada nodo interno. Las ramas se han codificado por colores. El nodo marcado con un asterisco se refiere al ancestro común más reciente. Se empleó como grupo externo la fosfolipasa de *Burkholderia pseudomallei* 668. En la figura se muestran los números de acceso proteicos en la base de datos NCBI, así como su correspondiente anotación. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

Como era de esperar, PlpV se ha agrupado con el resto de especies de *Photobacterium*, estando íntimamente relacionada con la fosfolipasa ortóloga de *P. damsela* subsp. *piscicida* (bootstrap = 100) (Fig. IV.29), dato que proporciona una evidencia convincente sobre su estrecha relación filogenética reflejada en la clasificación como subespecies. Corroborando estos datos, varios son los trabajos que ponen de manifiesto la presencia de fosfolipasas en diversas especies de *Vibrio*, pero pocos los destinados a *Photobacterium* spp. (Tabla IV.7). Ante las evidencias obtenidas hasta el momento, consideramos a PlpV como la enzima candidata a ser la responsable de la actividad fosfolipasa detectada en todos los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela*.



Tabla IV.7: Fosfolipasas homólogas a PlpV de especies de la familia Vibrionaceae estudiadas en profundidad. (PS) péptido señal; (LDH) hemólisis dependiente de lecitina

Enzima (Código acceso NCBI)	Especie productora	Características (%identidad/% cobertura)	Familia α/β - hidrolasa	Extracelular/ Termolábil	Expresada en <i>E. coli</i> / PS predicho	Actividad fosfolipasa	Actividad hemolítica	Virulencia	Referencias
Fosfolipasa Ppp (VDA_002242)	<i>P. damselae</i> subsp. <i>damselae</i>	- 1.218 pb/405 aa - 45.93 KDa	Familia GDSL	Si/Si	Si/Si	Fosfolipasa	-Hemólisis en sangre de trucha -No hemólisis en sangre de oveja y conejo	- Virulencia en lubina	El presente trabajo
Fosfolipasa PPP (BAB85814.1)	<i>P. damselae</i> subsp. <i>pliscida</i>	- 1.218 pb/405 aa - 46 KDa - (98% id., 100% cob.)	Familia GDSL	Si/Si	Si/Si	Fosfolipasa A ₂	-Hemólisis directa en sangre de peces (carpa, trucha arco iris, besugo, lubina, tilapia) y conejo. No en sangre de caballo y oveja - Hemólisis con adición de lectina en sangre de caballo y oveja	- Virulencia en cobia	Naka <i>et al.</i> (2007) Hsu <i>et al.</i> (2013)
Hemolisina termolábil TLH (KOE82195.1)	<i>V. alginolyticus</i>	- 1.254 pb/417 aa - 45 KDa - (61% id., 92% cob.)	Familia GDSL	Si/Si	Si/Si	Fosfolipasa de tipo desconocido	-Hemólisis en sangre de platija -No en sangre de oveja	-Apoptosis, cambios morfológicos y necrosis de enterocitos de dorada -Virulencia en pez cebra	Jia <i>et al.</i> (2010) Wong <i>et al.</i> (2012)
Fosfolipasa P/A (AAY26144.2)	<i>V. anguillarum</i>	- 1.251 pb/416 aa - 45 KDa - (59% id., 62% cob.)	Familia GDSL	Si/Si	Si/Si	Fosfolipasa A ₂	-Hemólisis en sangre de trucha arcoiris y salmón. -No hemólisis en sangre de oveja	-No relacionada con la virulencia en trucha arcoiris	Li <i>et al.</i> (2013)
Fosfolipasa/ Hemolisina PlpA2 (BAC96329.1)	<i>V. vulnificus</i>	- 1.251 pb/417 aa - 45 KDa - (57% id., 100% cob.)	Familia GDSL	Si/Si	Si/Si	Fosfolipasa A ₂	-Hemólisis en sangre de ratón y oveja	- Virulencia en ratón	Koo <i>et al.</i> (2007) Lim <i>et al.</i> (2012) Jang <i>et al.</i> (2017)

Tabla IV.7 (Cont.): Fosfolipasas homólogas a PlpV de especies de la familia Vibrionaceae estudiadas en profundidad. (PS) péptido señal; (LDH) hemólisis dependiente de lecitina

Enzima (Código acceso NCBI)	Especie productora	Características (% identidad/% cobertura)	Familia α/β - hidrolasa	Extracelular/ Termolábil	Expresada en <i>E. coli</i> / pSPredicho	Actividad fosfolipasa	Actividad hemolítica	Virulencia	Referencias
Hemolisina VHH (AAG25957.1)	<i>V. harveyi</i>	- 1.254 pb/418 aa - 45.6 KDa - (57% id., 92% cob.)	Familia GDLS	Si/Si	Si/Si	Fosfolipasa B/ Lisofosfolipasa	- Hemólisis en sangre de platija y rodaballo	- Virulencia en platija y rodaballo	Zhong <i>et al.</i> (2006) Sun <i>et al.</i> (2007) Bai <i>et al.</i> (2010)
Hemolisina termolábil LDH /TLH (BAA25328.1)	<i>V. parahaemolyticus</i>	- 1.254 pb/418 aa - 45 KDa - (55% id., 94% cob.)	Familia GDLS	Si/Si	Si/Si	Fosfolipasa A ₂ / Lisofosfolipasa	- Hemólisis en sangre de oveja dependiente de lectina	- SD	Shinoda <i>et al.</i> (1991)
Fosfolipasa PhA (AAG63951.1)	<i>V. mimicus</i>	- 1.410 pb/470 aa - 53 KDa - (55% id., 99% cob.)	Familia GDLS	Si/Si	Si/SD	Fosfolipasa A	- Hemólisis en sangre de conejo y peces (tilapia, trucha arcoiris). - No hemólisis en ratón, oveja y humano	- SD	Kang <i>et al.</i> (1998) Lee <i>et al.</i> (2002)
Fosfolipasa Lec (AAA92960.1)	<i>V. cholerae</i>	- 1.254 pb/418 aa - 45 KDa - (53% id., 100% cob.)	Familia GDLS	Si/Si	Si/Si	Fosfolipasa C	- SD	- Sin enterotoxigenidad en conejo	Fiore <i>et al.</i> (1997)

4.4.4. PlpV es la enzima responsable de la degradación de fosfolípidos en *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1

Para desentrañar la hipótesis de que PlpV es una enzima responsable de la hidrólisis de fosfolípidos en *P. damsela* subsp. *damsela*, procedimos en primer lugar, a la obtención de los mutantes por intercambio alélico simples Δdly (AR64), $\Delta plpV$ (AVL64) y doble $\Delta dly \Delta plpV$ (AVL66) en la cepa AR57 (\exists pPHDD1); así como un mutante simple $\Delta plpV$ (AVL58) en la cepa AVL49, carente de pPHDD1. En segundo lugar, visualizamos las actividades fosfolipasas de estos mutantes sembrados en placas de TSA-1 suplementadas con yema de huevo al 3%, tras 24 horas de incubación a 25 °C. Los cebadores diseñados sobre el genoma de la cepa tipo CIP 102761 para la construcción de estos mutantes por intercambio alélico, se muestran en la Tabla III.6 de Material y Métodos. Como se puede apreciar en la Fig. IV.30, la delección de *plpV* en la cepa AVL49 (\nexists pPHDD1) causó la completa abolición de la actividad fosfolipasa detectable en el medio elegido. Sin embargo, la supresión única de *plpV* en AR57, portadora del plásmido pPHDD1, afectó ligeramente al diámetro del halo de precipitado, manifestando que todavía existe en el genoma otra enzima con capacidad de degradar los fosfolípidos aportados al medio, es decir, la fosfolipasa D damselisina. Como cabía esperar, la delección de *plpV* en combinación con la delección del gen *dly*, abolió completamente la actividad fosfolipasa en la cepa AVL66 (Fig. IV.30B). Cabe mencionar que el halo producido por PlpV es mucho menor que el de una cepa que produce solo fosfolipasa Dly (Fig. IV.30), aunque no está claro si esta diferencia se debe a una menor actividad de PlpV o a diferencias en la expresión de los genes y/o en la secreción de las enzimas al espacio extracelular.

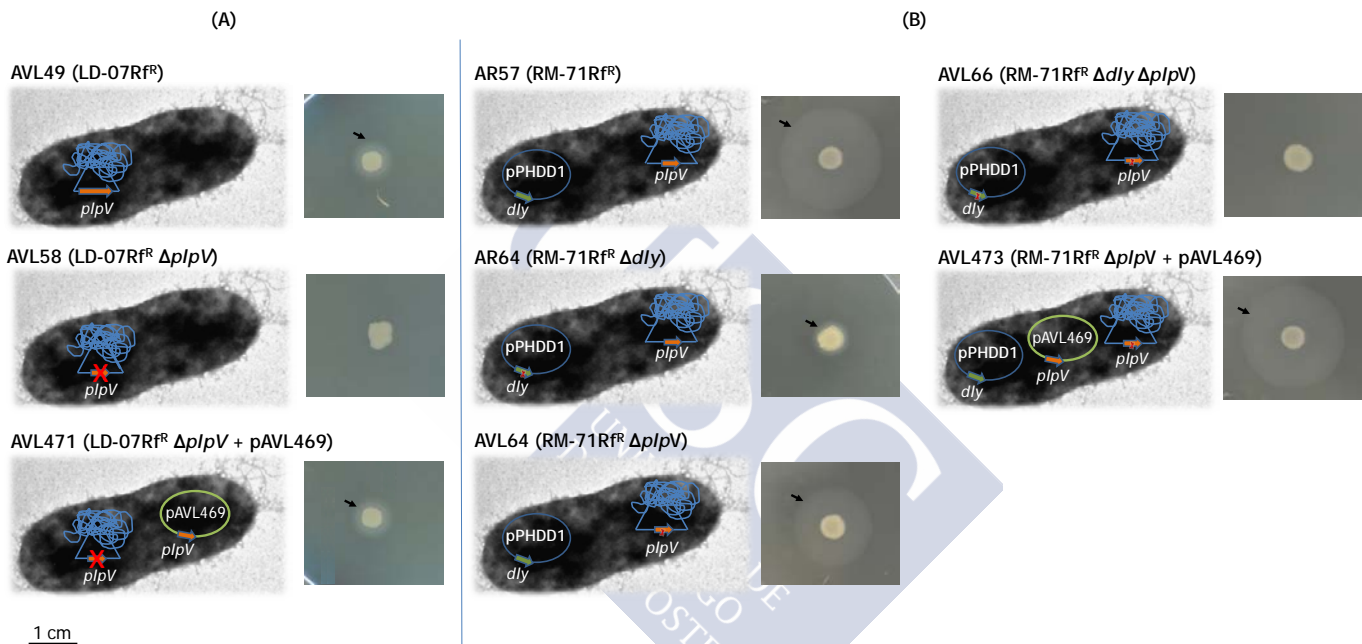


Fig. IV.30: Fenotipos fosfolipasa de (A) la cepa carente de pPHDD1 AVL49, del mutante simple AVL58 ($\Delta p/pV$) y de su cepa complementada AVL471 ($\Delta p/pV$ + pAVL469); y de (B) la cepa portadora de pPHDD1 AR57, de los mutantes simples AR64 (Δdly) y AVL64 ($\Delta p/pV$), del doble mutante AVL66 ($\Delta dly \Delta p/pV$) y de la cepa complementada AVL473 ($\Delta p/pV$ + pAVL469) de *P. damsela* subsp. *damsela* en placas de emulsión de yema de huevo (Oxoid) después de 24 horas de incubación a 25 °C. La barra de escala representa 1 cm.

Para demostrar que los fenotipos observados se debían exclusivamente a la delección del gen *plpV* y no a efectos polares u otras causas, se procedió a complementar las cepas mutantes con el alelo salvaje. Para ello, primeramente se amplificó por PCR el gen *plpV* incluyendo su promotor nativo (cebadores en Tabla III.7 de Material y Métodos), y posteriormente se clonó en el vector pBBR1-MCS5 (Kovach *et al.*, 1995). Al complementar los mutantes AVL58 (LD-07 $\Delta plpV$) y AVL64 (RM-71 $\Delta plpV$) con el plásmido pAVL469 (pBBR1-MCS5 que contiene el gen *plpV* y su promotor), se restauraron los patrones de actividad fosfolipasa mostrados por las cepas parentales (Fig. IV.30).

En conjunto, estos resultados indican sin lugar a dudas, que la actividad fosfolipasa en las cepas portadoras de pPHDD1 es ejercida predominantemente por Dly, con una contribución menor de PlpV. Por el contrario, en cepas sin plásmido, PlpV es la única responsable de la actividad fosfolipasa detectada en el ensayo de placas de extracto de yema de huevo.

4.4.5. Análisis *in silico* de la fosfolipasa PlpV: proteína lipolítica de la familia GDSL

El gen *plpV* consta de un total de 1.218 pb, cuya proteína PlpV predicha posee 405 aminoácidos con una masa teórica (sin péptido señal) de 45,93 KDa y pI de 6,51 (Stothard, 2000). La predicción de la estructura secundaria de PlpV realizada con el servidor Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015), que empleó como modelo la estructura secundaria de la acilhidrolasa EstA de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 3KVN; van den Berg, 2010), reveló que esta fosfolipasa presenta la estructura típica de la clase α/β -hidrolasas (Fig. IV.31). Concretamente, PlpV consta de un pliegue o “*fold*” característico de tres capas $\alpha/\beta/\alpha$, con cuatro láminas- β en paralelo (β 1, β 4, β 5, β 6) situadas asimétricamente hacia un extremo de la molécula (SCOP2 database: Andreeva *et al.*, 2014). Posee además, un par de láminas- β adicionales antiparalelas (β 3, β 2) que se encuentran dentro de un cruce de conexiones, un total de 9 hélices- α , y la Ser₁₄₂ como residuo nucleófilo del centro activo (Fig. IV.31). Asimismo, PlpV presenta el hueco oxianiónico de gran relevancia en la catálisis enzimática de las hidrolasas (Henderson,

1970), así como una región flexible posterior al nucleófilo Ser₁₄₂ (Fig. IV.31). Por otra parte, podemos incluir a PlpV como miembro de la superfamilia de las SGNH-hidrolasas, dado que presenta una estructura secundaria $\alpha/\beta/\alpha$ y la región flexible posterior a Ser₁₄₂, elementos característicos de la misma (Andreeva *et al.*, 2014; Flores-Díaz *et al.*, 2016).

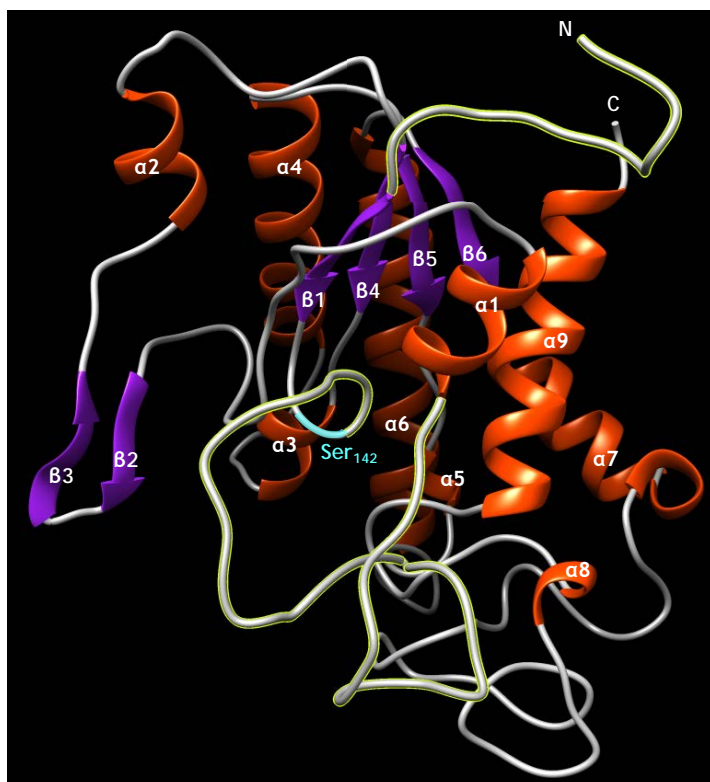


Fig. IV.31: Estructura de la hidrolasa PlpV predicha mediante Phyre2 y editada con UCSF Chimera 1.11.2 (Pettersen *et al.*, 2004). Se indica: en naranja las hélices- α , en magenta las láminas- β , en azul cian la serina nucleofílica, y en amarillo la gran cola N-terminal y la zona flexible posterior a la serina nucleofílica. Esta predicción muestra la estructura secundaria de la proteína entre los aminoácidos Asp₁₂₅ y Gln₄₀₂.

Las SGNH-hidrolasas reciben tal nomenclatura debido a la presencia de los cuatro residuos conservados SGNH, tal y como analizaremos seguidamente (Mølgaard *et al.*, 2000; Akoh *et al.*, 2004). Es necesario tener presente que la superfamilia de las SGNH-hidrolasas no solo incluye fosfolipasas, sino también una amplia gama de enzimas con diversas funciones hidrolíticas (lipasas, proteasas, tioesterasas, arilesterasas, lisofosfolipasas, carbohidrato esterasas y aciltransferasas) (Akoh *et al.*, 2004). Por su parte, las fosfolipasas SGNH-hidrolasas se localizan en todos los reinos de la vida y están ampliamente distribuidas entre la clase Gammaproteobacteria (Akoh *et al.*, 2004), tal y como ya hemos podido constatar en el apartado 4.4.3.

Las α/β -hidrolasas típicas contienen el denominado bolsillo nucleofílico, conformación proteica en la que el residuo nucleófilo está situado en un giro brusco entre una lámina- β y una hélice- α , dando a la columna vertebral del nucleófilo una tensión con conformación Y (Ollis *et al.*, 1992; Derewenda & Derewenda, 1991) (Fig. IV.32). Tal y como podemos visualizar en su predicción estructural, PlpV no posee este bolsillo nucleofílico, pero al igual que el resto de las SGNH-hidrolasas, exhibe en su lugar una zona flexible posterior al nucleófilo tal, que permite la proyección de la cadena corta de la serina hacia fuera de la estructura, haciéndola accesible a la histidina de la triada catalítica y al sustrato (Fig. IV.31; Fig. IV.32). De este modo, el centro activo es muy flexible, adaptándose a la unión de diferentes sustratos, de ahí la existencia de SGNH-hidrolasas con actividades hidrolíticas tan variadas, incluso en una misma enzima (Wei *et al.*, 1995; Bornscheuer, 2002; Akoh *et al.*, 2004). Así por ejemplo, la enzima multifuncional TAP de *E. coli* exhibe actividad tioesterasa, arilesterasa, esterasa, proteasa y lisofosfolipasa (Lo *et al.*, 2003).

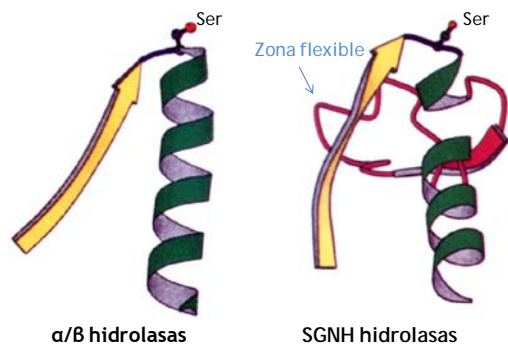


Fig. IV.32: Comparación de la zona próxima al nucleófilo Ser en α/β hidrolasas típicas y en SGNH-hidrolasas. Imagen modificada de Wei *et al.* (1995) (con permiso de Nature Publishing Group).

Desde otra perspectiva, el análisis de PlpV llevado a cabo con el servidor Pfam (Finn *et al.*, 2016), confirmó su clasificación dentro de la superfamilia de las SGNH-hidrolasas (número de acceso Pfam CL0264), y más concretamente de la familia GDSL (número de acceso Pfam PF00657). Tal y como podemos observar en la Fig. IV.33, como miembro de esta superfamilia, PlpV consta de los cinco bloques aminoacídicos característicos, así como de los cuatro residuos conservados SGNH: i) la S_{142} nucleofílica en el bloque I; ii) la G_{193} en el bloque II; iii) el N_{237} en el bloque III; y iv) la H_{382} en el bloque V.

Por otro lado, nos topamos con la curiosidad de que la triada catalítica (S-D-H) establecida por Mølgaard y colaboradores (2000) para esta superfamilia, tampoco está del todo conservada en PlpV, así como en la mayoría de sus homólogos de la familia *Vibrionaceae* (Fig. IV.33). En contraposición, la triada sí está conservada en los ejemplos de las especies más allegadas, que curiosamente son las más estudiadas, así que tal vez lo que es necesario son más estudios dirigidos a la familia *Vibrionaceae*. La triada catalítica es una organización determinada de aminoácidos que comprende un nucleófilo, un residuo ácido y una histidina. El nucleófilo más común de las α/β -hidrolasas es la serina, siendo la triada catalítica más usual serina-aspartato-histidina (Carr & Ollis, 2009; Ollis *et al.*, 1992). Así por ejemplo, Sun *et al.* (2007) demostraron la importancia de la serina nucleofílica del motivo SGNH para la actividad de la fosfolipasa homóloga VHH de *V. harveyi*. En PlpV, al igual que en las fosfolipasas de *Photobacterium* spp., *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum*, el residuo ácido de la triada constituido por el

aspartato, es reemplazado por uno neutro apolar, la glicina (Fig. IV.33). En las fosfolipasas de *V. mimicus* y Lec de *V. cholerae*, el residuo polar es el glutamato (Fig. IV.33), cambio que suele suceder en esterasas de alto peso molecular y en varias lipasas (Carr & Ollis, 2009), tal y como se describió por primera vez en la lipasa del hongo *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1991). De todos modos, tampoco es de extrañar el papel funcional de la glicina en una triada catalítica, ya que en otras hidrolasas está presente, como por ejemplo en las proteasas aspárticas (el motivo catalítico es D-X-G, donde X puede ser serina o treonina) o las serín-proteasas (que conservan la glicina en las proximidades de la serina catalítica en el motivo G-X-S-Y-G) (Rao *et al.*, 1998).

Con respecto a la familia GDSL, ésta se caracteriza por carecer del dominio conservado G-X-S-X-G típico de las α/β hidrolasas (Ollis *et al.*, 1992), y en su lugar presentar el motivo GDSL (Upton & Buckley, 1995). Este motivo se encuentra cercano al extremo N-terminal de la proteína, a diferencia de las hidrolasas con motivo G-X-S-X-G, que se localiza en el centro de la proteína (Lešćić Ašler *et al.*, 2017). El alineamiento de PlpV con sus homólogas reflejó la presencia del motivo GDS(L) en el bloque I de todas ellas, a pesar de no estar conservado del todo (Fig. IV.33). De ese modo, en las fosfolipasas del género *Photobacterium*, y por lo tanto en PlpV, el aminoácido neutro apolar leucina (L) pasa a ser sustituido por otro de las mismas características, la isoleucina (I), hecho que ya había sido comentado por varios autores (Arpigny & Jaeger, 1999; Akoh *et al.*, 2004), llegando a establecerse posteriormente como verdadero motivo conservado la secuencia GDS (Wilhelm *et al.*, 2011).

En otro orden de ideas, Flieger *et al.* (2002), observaron que las SGNH-hidrolasas podrían ser clasificadas a su vez en tres subgrupos, dependiendo de la ausencia (grupo A) o presencia de una cola N-terminal larga antes del bloque I (Grupo B), o de la existencia de un largo C-terminal que se extendería después del bloque V (Grupo C). De acuerdo con la clasificación de Flieger, PlpV podría ser incluida dentro del subgrupo B por presentar una larga cola en el extremo N-terminal (mucho más larga que la que se muestra en la Fig. IV.31, dado que ésta solo refleja la estructura secundaria adquirida entre la

entre la secuencia Asp₁₂₅ y Gln₄₀₂). Asimismo, en base a la clasificación de las enzimas lipolíticas de Arpigny & Jaeger (1999) realizada en base a sus propiedades y secuencias, las enzimas SGNH comprenderían la familia lipolítica II.

Organismo	Nº acceso	Función	Bloque I	
a)V. harveyi	AAG25957.1	hemolisina VHH	144	INKVVALGDSLSDT
b)V. parahaemolyticus	BAA25328.1	LDH	144	INKVVALGDSLSDT
c)V. vulnificus	BAC96329.1	fosfolipasa/hemolisina	143	INKIVAFGDSLSDT
d)V. mimicus	AAC63951.1	lecitinasa Ph1A	198	INKVIVFGDSLSDT
e)V. cholerae	AAA92960.1	lecitinasa Lec	146	ISKVIAFGDSLSDT
f)V. alginolyticus	KOE82195.1	hemolisina termolábil TLH	143	INRVIALGDSLSDT
g)V. anguillarum	AAY26144.2	fosfolipasa/lecitinasa PLA	143	INKMVTIGDSLSDT
h)P. damsela subsp. damsela PlpV	VDA_002242	fosfolipasa	133	INKIVSFGDSISDT
i)P. damsela subsp. piscicida	BAB85814.1	fosfolipasa PPP	133	INKIVSFGDSISDT
j)P. ganghwense	KLV06831.1	hemolisina termolábil	154	INKVISLGDSISDT
k)P. profundum	EAS45605.1	posible fosfolipasa	151	INKIISFGDSISDT
l)P. sanguinicancri	KXI21946.1	hemolisina termolábil	147	INKIISFGDSISDT
m)P. swingsii	KMV28906.1	hemolisina termolábil	147	INKIISFGDSISDT
n)Salmonella enterica	ATE05504.1	efector secretado SseJ	142	ITRLVFFGDSLSDS
o)Legionella pneumophila	AAN63820.1	lisofosfolipasa A	21	LNNIVVFGDSLSDN
p)Aeromonas hydrophila	CAA30260.1	aciltransferasa	25	FSRIVMFGDSLSDT
q)Aeromonas salmonicida	CAA50021.1	aciltransferasa	25	FSRIVMFGDSLSDT
				...: :***:***

Bloque II	Bloque III	Bloque IV	Bloque V
a)195 LPLYNWAVGGAA	a)239 TLFTLEFGLNDFMNYNR	a)274 AGAKNLLMLTLPD	a)388 FWDVTHPT
b)195 LPLYNWAVGGAA	b)239 TLFTLEFGLNDFMNYNR	b)274 AGAKNFMMLTLPD	b)388 FWNVTHPT
c)194 LPLYNWAVGGAA	c)238 TLFTLEFGLNDFMNYNR	c)273 AGAKNIMMLTLPD	c)387 FWGVTHPT
d)249 VPIYNWAVGGAA	d)293 SLFTLEFGLNDFMNYNR	d)328 ARAKNIVLLTLPD	d)442 FWEVTHPT
e)198 LPLYNWAVGGAA	e)241 SLFTLEFGLNDFMNYNR	e)276 AGAKNLVMLTLPD	e)390 FWEVTHPT
f)194 LPLYNWAVGGAA	f)238 TLFTLEFGLNDFMNYNR	f)273 SGAKNIILFTLPD	f)387 FWGVTHPT
g)194 LPLYNWAVGGAA	g)238 TLFTLEFGLNDFMNYNR	g)273 SGAKNIILLTLPD	g)387 FWGVTHPT
h)184 LPLYTWAVGGAA	h)228 TLFTIEFGLNDFINYNR	h)263 NGAENIVVLTLPD	h)377 FWGVTHPT
i)184 LPLYTWAVGGAA	i)228 TLFTIEFGLNDFINYNR	i)263 NGAENIVVLTLPD	i)377 FWGVTHPT
j)205 LPMYNWAVGGAA	j)249 SLFTMEFGLNDFVNYNR	j)284 NGAQHIVILNLPD	j)398 FWGVTHPT
k)202 LPLYTWAVGGAA	k)246 SLFTIEFGLNDFVNYDR	k)281 NGAENILVLNLPD	k)395 FWGVTHPT
l)198 LPLYTWAVGGAA	l)242 SLFTIEFGLNDFVNYNR	l)277 NGANNIVVLNLPD	l)391 FWGVTHPT
m)198 LPLYTWAVGGAA	m)242 SLFTIEFGLNDFVNYNR	m)277 NGANNIVVLNLPD	m)391 FWGVTHPT
n)196 KEMLNFAEGGST	n)237 DLAIFFLGANDYMTLHK	n)273 GGVNNVLMGIPD	n)379 FNDLVHPT
o)77 SHLLDYAFGGAG	o)121 SLFVIWIGANNYLGMPV	o)160 KGAKHILVLNLPD	o)277 FFDLVHPT
p)78 -TIANEAEGGPT	p)124 DLVILWVGANDYLAYGW	p)162 NGAKEILLFNLPD	p)304 FWDQVHPT
q)78 -TIANEAEGGAT	q)124 DLVILWVGANDYLAYGW	q)163 NGAKQILLFNLPD	q)304 FWDQVHPT
: * **	* : . * *:: : **	* .***

Fig. IV.33: Alineamiento de la fosfolipasa PlpV de *P. damsela* subsp. *damsela* con miembros de la superfamilia SGNH realizado con Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). Las secuencias de 16 enzimas homólogas a PlpV son alineadas a lo largo de los cinco bloques conservados de la superfamilia. En naranja se indican los residuos pertenecientes a la tríada catalítica. Los recuadros señalan los residuos conservados de la superfamilia SGNH. En subrayado se indica el motivo GDSX característico de la familia GDSL. Los dígitos presentes antes de cada bloque muestran la posición del aminoácido en el que se inician cada uno de ellos.

En base a este estudio, podemos decir que la fosfolipasa PlpV de *P. damsela* subsp. *damsela*, cumple los requisitos propuestos por las clasificaciones de Arpigny & Jaeger (1999), Mølgaard *et al.* (2000), Flieger *et al.* (2002) y Finn *et al.* (2016), para ser considerada como miembro de la superfamilia de las SGNH-hidrolasas, subgrupo B y familia GDSL o familia II, respectivamente.

4.4.6. PlpV es una fosfolipasa extracelular con carácter termolábil

Las bacterias producen dos tipos de fosfolipasas, unas extracelulares y otras asociadas a membrana, siendo incluso algunos de estos microorganismos capaces de producir ambos (Schmiel & Miller, 1999; Green & Mecsas, 2016). Los estudios realizados hasta el momento, solo nos permiten afirmar que PlpV es una enzima con actividad fosfolipasa, pero no de que se trate de una fosfolipasa secretada, tal y como los experimentos de Fouz *et al.* (1993) y Labella *et al.* (2010a) insinúan, al detectar esta capacidad enzimática en los productos extracelulares de diversas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*.

Con el fin de constatar que PlpV es una fosfolipasa secretada al medio extracelular, decidimos estudiar si los productos extracelulares de la cepa AVL49 (≠ pPHDD1) eran capaces de hidrolizar la lecitina aportada al medio de cultivo. El resultado mostrado en la Fig. IV.34 corrobora los estudios previos, afirmando claramente que PlpV es la única fosfolipasa secretada al medio extracelular (al menos detectable bajo nuestras condiciones experimentales), y no una enzima que permanece anclada a la membrana de la bacteria. Al igual que PlpV, se ha verificado el carácter secretable de sus homólogos: PPP de *P. damsela* subsp. *piscicida*, TLH de *V. alginolyticus*, PLA de *V. anguillarum*, PlpA2 de *V. vulnificus*, VHH de *V. harveyi*, LDH de *V. parahaemolyticus*, PhlA de *V. mimicus* y Lec de *V. cholerae* (Tabla IV.7).

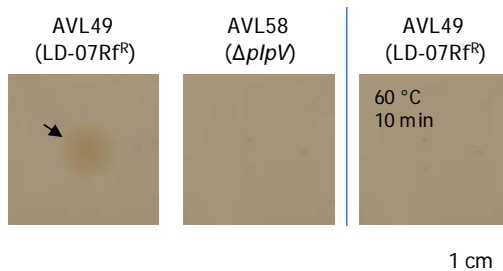


Fig. IV.34: Evaluación de la actividad fosfolipasa de los productos extracelulares de la cepa AVL49 (LD-07Rf^R) y AVL58 ($\Delta plpV$), y pérdida de la misma tras su incubación durante 10 minutos a 60 °C. La obtención de los productos extracelulares se llevó a cabo mediante la técnica de celofán descrita por Liu (1957) (sección 3.10, de Material y Métodos). La barra de escala representa 1 cm.

Asimismo, todas las fosfolipasas homólogas a PlpV fueron descritas como enzimas termolábiles (Tabla IV.7), por lo que decidimos analizar este carácter en nuestra fosfolipasa PlpV. Para ello, procedimos a la incubación de los productos extracelulares de la cepa parental AVL49 y del mutante simple AVL58 a 60°C durante 10 min. Seguidamente detectamos la actividad fosfolipasa en placas de TSA-1 suplementadas con yema de huevo (3%) tras la incubación a 25 °C durante 48 horas, lo cual resultó en la abolición de la degradación de los fosfolípidos del medio (Fig. IV.34). Este resultado revela claramente el carácter termolábil de PlpV, dato que ya apuntaban Fouz *et al.* (1993).

A fin de iniciar un estudio preliminar que nos aportase información acerca del modo de secreción de PlpV, decidimos clonar esta enzima en *Escherichia coli*, microorganismo sin capacidad fosfolipasa. Si esta especie bacteriana fuese capaz de degradar los fosfolípidos, nos estaría sugiriendo que, tal vez, la secreción de PlpV se realiza mediante un sistema de secreción general y conservado en las bacterias. Para ello, transformamos mediante electroporación la cepa S17-1- λ pir de *E. coli* con el plásmido conjugativo pAVL469 (portador del gen *plpV* y su promotor). Como nos muestra la Fig. IV.35, *E. coli* adquiere la capacidad de hidrolizar los fosfolípidos aportados al medio de cultivo tras tres días de incubación a 25 °C. Del mismo modo, todas las fosfolipasas homólogas a PlpV de *Vibrio* spp. se expresaron tras ser clonadas en esta enterobacteria (Tabla IV.7).

Este resultado sugiere que PlpV podría ser secretada al exterior a través de un sistema de transporte conservado entre diferentes especies, no siendo específico para *P. damsela* subsp. *damsela*.

Simultáneamente, realizamos una búsqueda *in silico* de un posible péptido señal en la secuencia aminoacídica de PlpV, secuencia necesaria para la exportación de productos a través de determinados sistemas de secreción bacterianos. La predicción obtenida a través del servidor SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011), apunta que PlpV podría presentar un péptido señal de 20 aminoácidos de longitud en el extremo N-terminal, cuya secuencia es MKKSVLTLTLALLCSQNVFA y que por lo tanto, podría ser secreta al medio extracelular a través de un sistema de secreción general Sec-dependiente (Thanassi *et al.*, 2005). Al igual que PlpV, en todas las fosfolipasas de *Vibrio* spp. homólogas se ha predicho un péptido señal de esta índole (Tabla IV.7). En la sección 4.8 de Resultados y Discusión se abordará la cuestión de la secreción de PlpV al medio extracelular.

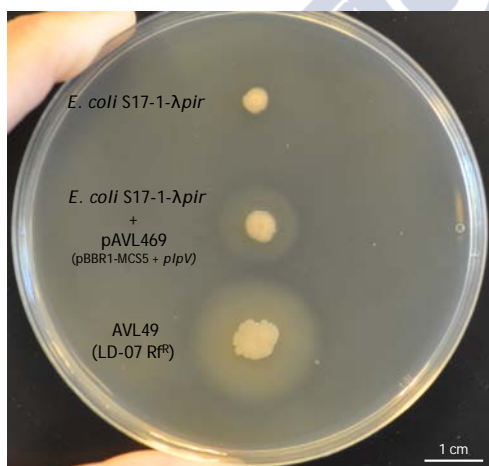


Fig. IV.35: Transformación de la especie fosfolipasa negativa *Escherichia coli* en fosfolipasa positiva, tras su complementación con el gen *plpV* de *P. damsela* subsp. *damsela*.

4.4.7. PlpV de *P. damsela* subsp. *damsela*, ¿una fosfolipasa de tipo A₂?

En base a los datos obtenidos en los apartados anteriores, podemos afirmar que PlpV es una enzima capaz de hidrolizar los fosfolípidos presentes en el medio de cultivo, pero desconocemos en qué enlace exacto del fosfolípido es capaz de hacerlo. Tal y como ya se ha mencionado en la introducción, las fosfolipasas se clasifican en A (1/2), B, C y D, tomando como criterio el enlace de ataque al fosfolípido (Mollby, 1978). Pocos son los estudios dirigidos al conocimiento de la actividad fosfolipasa en especies de la familia *Vibrionaceae*, y los que existen, están centrados principalmente en especies patógenas del género *Vibrio*. La bibliografía actual nos aporta ejemplos de los cuatro tipos de fosfolipasas en los géneros *Photobacterium* y *Vibrio* (Tabla IV.7). Con el propósito de catalogar a PlpV dentro de la clasificación anterior, procedimos a realizar un análisis filogenético empleando el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), a partir de las secuencias proteicas de las fosfolipasas homólogas a PlpV, así como de fosfolipasas ya anotadas por el servidor NCBI (Tatusova *et al.*, 2013).

El árbol filogenético obtenido presenta un patrón de ramificación interna robusto, dados los valores de bootstrap mostrados en las ramas correspondientes a la agrupación de los cuatro tipos de fosfolipasas ($\cong 100$), a pesar de que su ramificación basal no sea tan consistente (Fig. IV.36). Si bien en algunos casos las fosfolipasas de *Vibrio* y *Photobacterium* agrupan juntas (fosfolipasas de tipo D y A₂), en la mayor parte de los casos vemos una clara separación entre estos dos géneros, especialmente en las fosfolipasas C. De igual manera, nos llama la atención que Dly (fosfolipasa D) de *P. damsela* subsp. *damsela* esté más relacionada con enzimas del género *Aeromonas* que con las fosfolipasas D de *Vibrio* spp. También atrajo nuestro interés el hecho de que la fosfolipasa C de *V. cholerae* (Lec) haya sido agrupada con fosfolipasas A₂, y no junto con las enzimas de su mismo tipo. Con respecto a VHH de *V. harveyi*, su agrupación con fosfolipasas A₂ no nos ha parecido extraña, dado que ésta se ha clasificado como lisofosfolipasa o fosfolipasa B. Centrándonos en el objetivo de este análisis, por su parte, PlpV ha sido fuertemente

agrupada con las fosfolipasas A₂ de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* (Lee *et al.*, 2002), *Vibrio vulnificus* (Lim *et al.*, 2012), *Vibrio anguillarum* (Li *et al.*, 2013) y *P. damsela* subsp. *piscicida* (Hsu *et al.*, 2013). Las fosfolipasas A₂ se caracterizan porque hidrolizan el enlace éster entre el segundo acilo y el glicerol de los fosfolípidos, liberando un ácido graso junto con un lisofosfolípido (Fig. I.12 de Introducción). Si bien este análisis solo es orientativo, nos permite al menos, hipotetizar sobre el tipo de fosfolipasa que podría ser PlpV, y en base a esto, escoger el sustrato idóneo para su posterior confirmación mediante ensayos enzimáticos.



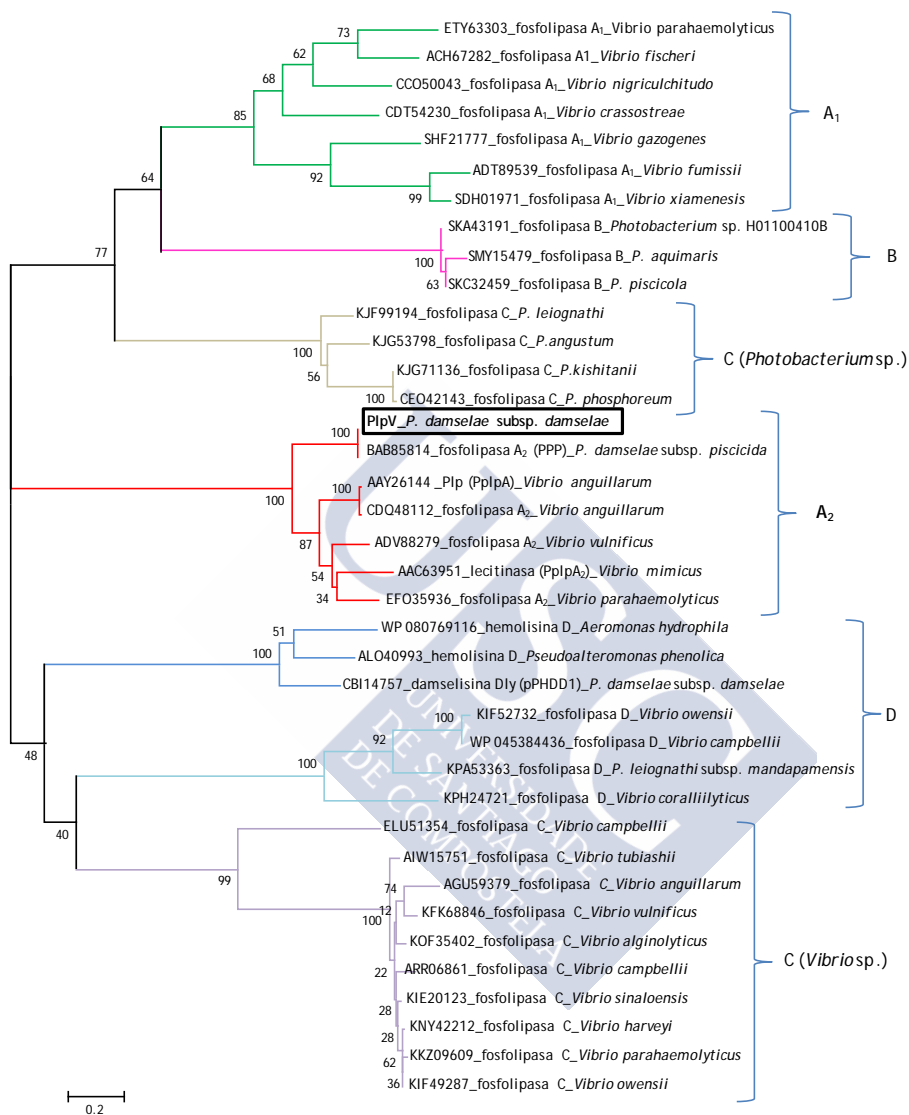


Fig. IV.36: Árbol filogenético de las fosfolipasas A, B C y D producidas por diversas especies de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* y *Pseudoalteromonas*. Análisis *in silico* construido empleando el método Neighbor-joining (1000 bootstraps) y el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). En la figura se muestran los números de acceso en GenBank de las proteínas. Los colores indican los agrupamientos principales. En recuadro destacamos la presencia de PIPV de *P. damselae* subsp. *damselae* dentro del grupo de las fosfolipasas de tipo A₂. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

Curiosamente la fosfolipasa LDH de tipo A₂ de *V. parahaemolyticus* ha mostrado de manera adicional actividad lisofosfolipasa (Shinoda *et al.*, 1991). Es decir, en primer lugar la fosfolipasa A₂ hidroliza el enlace sn-2 de la fosfatidilcolina, y seguidamente actúa sobre la lisofosfatidilcolina originando glicerolfosfatidilcolina (Fig. IV.37A).

Como resultado de esta acción, en los ensayos de actividad fosfolipasa en placas de agar se podían diferenciar dos halos de hidrólisis distintos: un halo externo transparente y un halo interno opaco de mayor diámetro (Shinoda *et al.*, 1991). Según los experimentos llevados a cabo por Shinoda *et al.* (1991), el halo exterior refleja la presencia de lisofosfatidilcolina y ácidos grasos, mientras que en el halo interior hay glicerolfosfatidilcolina y una mayor cantidad de ácidos grasos que precipitan. Como se puede observar en la Fig. IV.37B, PlpV de *P. damsela* subsp. *damsela*, al igual que las fosfolipasas LDH de *V. parahaemolyticus*, exhibe dos halos de hidrólisis perfectamente diferenciables tras su crecimiento en placas de TSA-1 suplementadas con yema de huevo. Este resultado podría ser el reflejo del progreso de la acción de PlpV, tal vez una fosfolipasa de tipo A₂ que parece además poseer actividad lisofosfolipasa adicional.

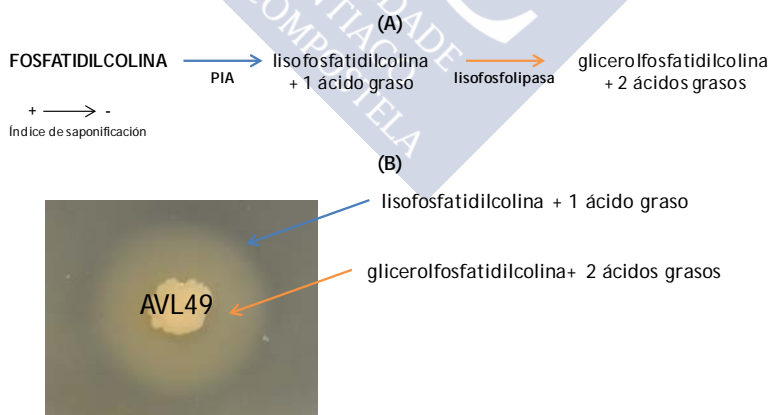


Fig. IV.37: (A) Esquema de la acción hidrolítica de las enzimas fosfolipasa A (PIA) y lisofosfolipasa sobre el fosfolípido fosfatidilcolina. Se indica el grado de saponificación del fosfolípido y productos derivados. (B) Halos de hidrólisis diferenciales observados en la cepa AVL49, tras su crecimiento en placas de TSA-1 suplementadas con yema de huevo.

4.4.8. Actividades enzimáticas adicionales de PlpV: capacidad hemolítica

Como ya hemos comentado, la capacidad bacteriana de lisar eritrocitos puede ser el resultado de la acción de toxinas formadoras de poro o de fosfolipasas, cuyos mecanismos de acción son diferentes (Sun *et al.*, 2007). Curiosamente, las fosfolipasas homólogas a PlpV poseen actividad hemolítica además de la actividad fosfolipasa (Tabla IV.7). Con la finalidad de determinar el carácter hemolítico de la fosfolipasa PlpV, sembramos la cepa AVL63 (mutante para la hemolisina PhlyC y productora de PlpV) en sangre de oveja, de conejo y de trucha. La sensibilidad de los eritrocitos de peces y mamíferos mostró ser diferente ante la actividad de PlpV (Fig. IV.38). PlpV no es capaz de lisar los eritrocitos de oveja y de conejo, ya que en el mutante AVL63, todavía productor de la fosfolipasa PlpV, se abolieron las actividades hemolíticas, y por el contrario, el mutante para *plpV* AVL58, todavía las presenta. A este respecto, tal y como ya se ha confirmado, PhlyC es la responsable del fenotipo hemolítico observado en sangre de oveja y de conejo (Fig. IV.38AC). En contraposición, la fosfolipasa PlpV sí posee la capacidad de hemolizar la sangre de trucha, ya que el mutante AVL63 exhibe dicha capacidad y, por el contrario, el mutante AVL58 no (Fig. IV.38B). Como era de esperar, el doble mutante $\Delta plpV \Delta hlyA_{cr}$ no produjo hemólisis en eritrocitos de oveja, conejo y trucha (Fig. IV.38). Estos resultados apuntan claramente que PlpV es la responsable de la capacidad hemolítica en sangre de trucha, pero no de la lisis de eritrocitos de oveja y conejo. En cambio, en los experimentos de Rivas *et al.* (2013b), una cepa *plpV*-positiva y portadora de pPHDD1, pero sin capacidad de síntesis de Dly, PhlyC y PhlyP, no era capaz de lisar los eritrocitos de rodaballo. Ante estas evidencias, podemos sugerir que PlpV tiene diferente actividad o especificidad dependiendo de la especie de pez. Esta selectividad del tipo de eritrocito podría explicarse por diferencias en las composiciones lipídicas de las membranas celulares (Ivanov, 2007). Así, por ejemplo, las fosfolipasas homólogas a PlpV también presentan diferencias hemolíticas a este respecto (Tabla IV.7): PhlA de *V. mimicus* presenta actividad hemolítica en sangre de conejo, tilapia y trucha arco iris,

pero no en sangre de ratón, oveja y humano (Kang *et al.*, 1998); PLA de *V. anguillarum* es hemolítica en sangre de trucha arco iris y salmón, pero no en oveja (Li *et al.*, 2013); la hemolisina termolábil TLH de *V. alginolyticus* es hemolítica para sangre de platija pero no para sangre de oveja (Jia *et al.*, 2010); la fosfolipasa PPP de *P. damsela* subsp. *piscicida* es hemolítica en eritrocitos de varias especies de peces y conejo, pero no de caballo y oveja (Naka *et al.*, 2007), e incluso la damselisina Dly de *P. damsela* subsp. *damsela* es hemolítica para sangre de ratón y rodaballo, pero no para oveja (Rivas *et al.*, 2013b).

Es bien conocido que las fosfolipasas A del veneno de serpientes y abejas exhiben un fenómeno denominado hemólisis indirecta por hidrólisis de fosfatidicolina a lisofosfatidilcolina, agente fuertemente hemolítico que debido a su actividad superficial disocia las membranas de los eritrocitos (Shinoda *et al.*, 1991) (Fig. IV.39). En la relativo a las fosfolipasas bacterianas, Yanagase *et al.* (1970) informaron acerca de un factor hemolítico (posteriormente nombrado hemolisina TLH) en *V. parahaemolyticus*, el cual se activaba con la adición de lecitina al medio, por lo que pasó a ser denominada como hemolisina dependiente de lecitina (LDH). Esta designación hace referencia a la aparición de la capacidad de hemolizar determinados tipos de sangre solo cuando la lecitina esté presente en el medio de cultivo. Posteriormente, la fosfolipasa PPP de *P. damsela* subsp. *piscicida* sería considerada como de este tipo, al ser capaz de hemolizar sangre de caballo y oveja tras la adición de lecitina (Naka *et al.*, 2007). Gracias a este aporte al medio de cultivo, esta fosfolipasa, que solo era capaz de lisar de manera directa eritrocitos de diversas especies de peces y de conejo, exhibió una capacidad hemolítica indirecta para eritrocitos de caballo y oveja (Zong *et al.*, 2006; Naka *et al.*, 2007).

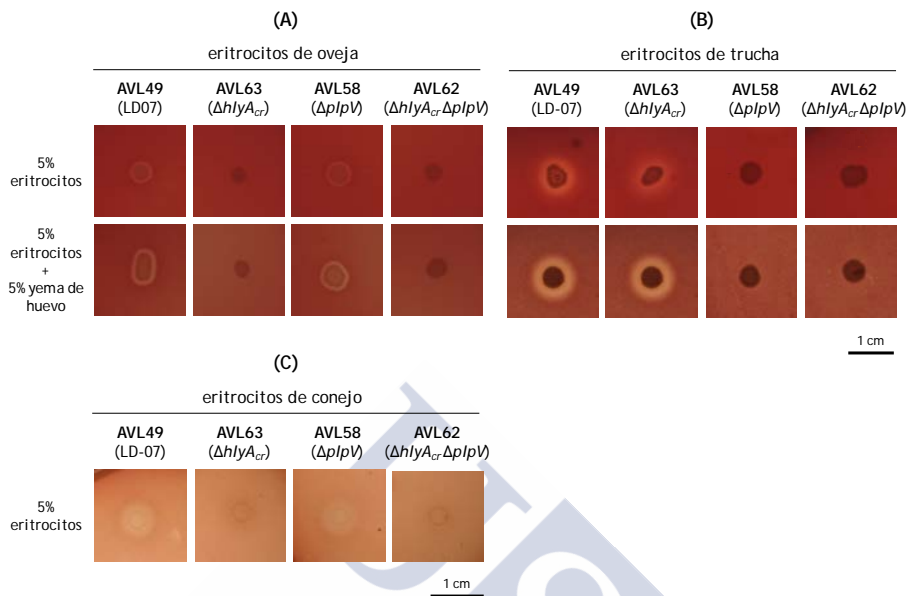


Fig. IV.38: Actividades hemolíticas en sangre de oveja (A) y de trucha (B) de la cepa carente de plásmido AVL49 de *P. damsela* subsp. *damsela* y mutantes derivados, en placas de TSA-1 suplementadas con 5% de sangre de oveja o trucha, ya sea en presencia o ausencia de lecitina (suplementado con 5% de emulsión de yema de huevo). (C) Actividades hemolíticas de los productos extracelulares (3 mg/mL) de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* indicadas en sangre de conejo. *hlyA_{cr}* y *plpV* son los genes del cromosoma I que codifican la hemolisina PhlyC y la fosfolipasa PlpV, respectivamente. Tiempo de incubación de 24 horas. Las barras de escala representan 1 cm.

Para estudiar este carácter variable en la fosfolipasa PlpV, decidimos añadir emulsión de yema de huevo al 5% en las placas de TSA-1 suplementadas con sangre al 5%. Si bien es cierto que la adición de lecitina a los eritrocitos de oveja conllevó un ligero aumento en la translucidez del halo hemolítico ocasionado por PhlyC, PlpV sigue sin exhibir actividad hemolítica en este medio (Fig. IV.38A). Por el contrario, la fosfolipasa PPP de la subsp. *piscicida* mostró actividad hemolítica en sangre de oveja con lecitina (Naka *et al.*, 2007). La presencia de este sustrato mejoró claramente la hemólisis en eritrocitos de trucha en cepas *plpV*-positivas de *P. damsela* subsp. *damsela*, no solo en términos de translucidez sino también en términos de su diámetro (Fig. 38B). Resultados similares

surgieron con la fosfolipasa PPP de la subsp. *piscicida*, cuyas hemólisis en diversos eritrocitos de peces se vieron mejoradas con la adición de lecitina (Naka *et al.*, 2007). Una posible explicación radicaría en la acción detergente sobre los eritrocitos, de la lisofosfatidilcolina, metabolito secundario generado de la hidrólisis de fosfatidilcolina por una fosfolipasa de tipo A₂ (Fig. IV.39).



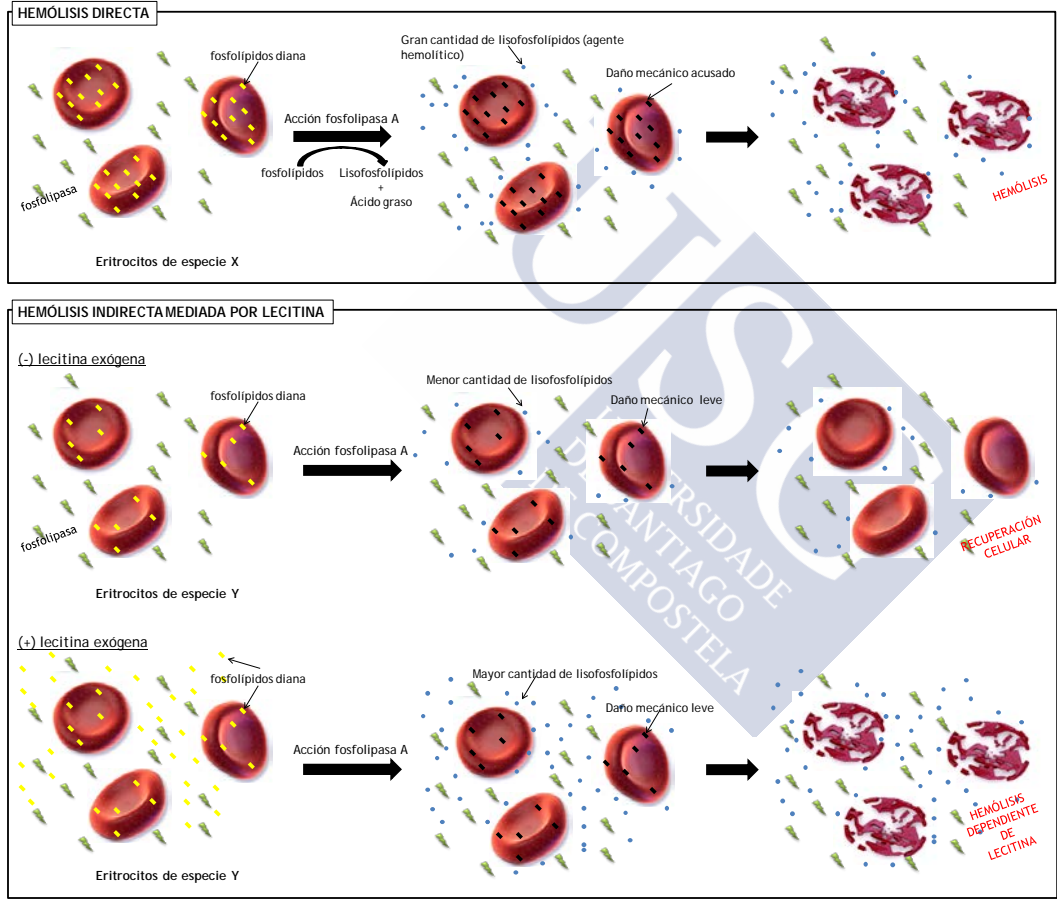


Fig. IV.39:
Representación esquemática de hemólisis directa e indirecta inducida por la acción hidrolítica de una fosfolipasa de tipo A.

Curiosamente, la fosfolipasa PPP de *P. damsela* subsp. *piscicida* exhibe la actividad hemolítica dependiente de lecitina en sangre de oveja y caballo, solamente tras 48 horas de incubación (Naka *et al.*, 2007). Dado que nuestro experimento se visualizó tras 24 horas, repetimos el proceso pero incubando en esta ocasión durante 48 horas. Tal y como podemos observar en la Fig. IV.40, PlpV muestra en sangre de oveja actividad hemolítica dependiente de lecitina tras 48 horas de incubación. Además, podemos ver claramente la diferencia del halo hemolítico originado por PhlyC y PlpV, siendo éste mucho más nítido y definido en el caso de la toxina formadora de poro. Estos datos sugieren que la actividad hemolítica dependiente de lecitina exhibida por PlpV depende de la dosis y tiempo de incubación, así como de la especie de eritrocitos.

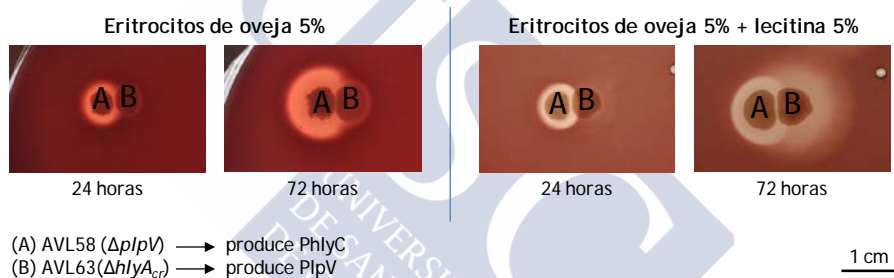


Fig. IV.40: Actividad hemolítica de AVL58 ($\Delta plpV$) y AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$) en placas de agar sangre de oveja al 5%, suplementadas o no con emulsión de yema de huevo al 5%.

Continuando con la búsqueda de actividades enzimáticas adicionales, tal y como se ha mencionado, las hidrolasas SGNH presentan la capacidad de hidrolizar sustratos diversos debido a la presencia de una zona flexible posterior a la serina nucleofílica. De este modo, se han hallado enzimas SGNH/GDSL con más de una capacidad enzimática, como es el caso de la enzima extracelular SrLip de *Streptomyces rimosus* con actividades lipasa (en medios tween) y fosfolipasa, entre otras (Lešćić Ašler *et al.*, 2017). Por ello, decidimos revisar si PlpV presentaba capacidad lipolítica en los medios tween 80 y tween 20, sembrando la cepa parental AVL49 y la cepa mutante para el gen *plpV* (AVL58) en placas de TSA-1 suplementadas con tween

80 y tween 20 al 1% (sección 3.12.2.1 de Material y Métodos). PlpV, al igual que la fosfolipasa VHH de *V. harveyi* (Zong *et al.*, 2006), no parece presentar actividad lipolítica en tween-80 y tween 20, dado que el mutante para *plpV* mantiene intactas estas actividades, presentes también en la cepa salvaje (Fig. IV.41). Además, la enzima TAP de *E. coli* perteneciente a las SGNH-hidrolasas, presenta actividad proteasa además de varias actividades lipolíticas (Pacaud & Uriel, 1971; Lo *et al.*, 2003). Con respecto a la fosfolipasa PlpV, ésta no va a presentar actividad proteolítica adicional dado que los aislados de *P. damselae* subsp. *damselae* ya no presentan dicha actividad (al menos detectable en medio suplementado con caseína), y no todos los aislados presentan actividad gelatinasa detectable en placa (Tabla IV.4).

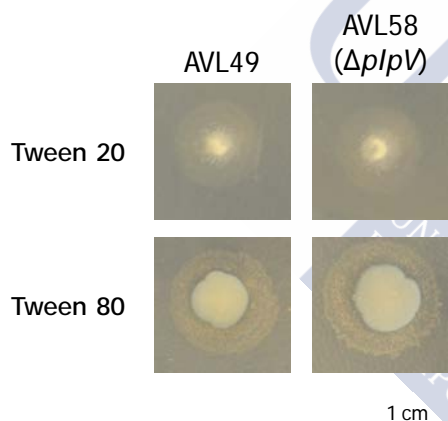


Fig. IV.41: Actividades lipolíticas en medios tween 20 y tween 80 de la cepa parental AVL49 y la cepa mutante para *plpV* AVL58.

En conclusión, estos resultados indican que, de manera adicional a la actividad fosfolipasa, PlpV es la principal responsable de la actividad hemolítica sobre eritrocitos de trucha en cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* no portadoras de pPHDD1. Asimismo, la acción de PlpV ocasiona la hemólisis indirecta de sangre de oveja ante la presencia de lecitina, acción dependiente de dosis, tiempo y tipo de eritrocitos empleados en el análisis.

4.4.9. PlpV contribuye a la virulencia para lubina, en cepas carentes de pPHDD1

Trabajos previos han reflejado la participación de las fosfolipasas en procesos virulentos de patógenos diversos, tales como la invasión y colonización bacterianas, así como la evasión de las defensas del hospedador. Así por ejemplo, fosfolipasas de tipo A implicadas son: PLA₁ y PLA₂ de *Helicobacter pylori*, que ayudan en la colonización de la mucosa gástrica permitiendo el crecimiento a bajo pH y la activación de MARPK (Dorrell *et al.*, 1999; Tannaes *et al.*, 2005; Sitaraman *et al.*, 2012); la fosfolipasa PlkB de *Legionella pneumophila*, que propicia la replicación bacteriana en el pulmón y la diseminación por el bazo, y modula el reclutamiento de macrófagos (Schunder *et al.*, 2010); YplA de *Yersinia enterocolitica* que participa en la colonización e induce necrosis (Schmiel *et al.*, 1998); o la fosfolipasa ExoU de *Pseudomonas aeruginosa*, que actúa como disruptor de membranas plasmáticas y altera la señalización celular (Sato & Frank 2014; Ramirez *et al.*, 2012). Con respecto a fosfolipasas C, nos encontramos con la α -toxina de *Clostridium perfringens*, inductora de la cascada del ácido araquidónico y la producción de radicales libres, y promotora del daño lisosomal e inductora de la agregación plaquetaria promoviendo la trombosis (Titball *et al.*, 1999; Monturiol-Gross *et al.*, 2012 Monturiol-Gross *et al.*, 2014; Bryant *et al.*, 2003); PlcH de *Pseudomonas aeruginosa* que activa y recluta plaquetas, ocasionando trombosis (Vasil *et al.*, 2009); o la fosfolipasa PlcA de *Listeria monocytogenes* que permite el escape del fagosoma así como de la defensa autofágica y facilita la propagación célula-célula (Camilli *et al.*, 1993; Nagiec *et al.*, 2004; Poussin *et al.*, 2009). También hemos localizado fosfolipasas D relacionadas con la virulencia, como YMT de *Yersinia pestis* que permite la supervivencia en el intestino del hospedador (Hinnebusch *et al.*, 2002), PLD1, PLD2 y PLD3 de *Acinetobacter baumannii* que facilitan la invasión bacteriana (Jacobs *et al.*, 2010; Stahl *et al.*, 2015), o PldA y PldB de *Pseudomonas aeruginosa* que promueven la invasión intracelular en células no fagocíticas y son necesarias para la persistencia bacteriana en el pulmón del hospedador (Jiang *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2013). Teniendo presente toda esta información, y

recordando que tanto el mutante para *hlyA_{cr}* (AVL63) obtenido en este trabajo, como cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1 con el gen *hlyA_{cr}* inactivado presentan un cierto grado de virulencia en lubina (Terceti *et al.*, 2016), sumado al hecho de que PlpV es ubicua en la subespecie, el siguiente paso a seguir fue el de analizar la contribución de la fosfolipasa PlpV, junto con la hemolisina cromosómica PhlyC, a la virulencia de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1.

Para ello, analizamos las capacidades virulentas de la cepa salvaje AVL49 (LD-07Rf^R), de los mutantes simples AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$) y AVL58 ($\Delta plpV$), y del doble mutante AVL62 ($\Delta hlyA_{cr} \Delta plpV$) en lubinas. Es necesario resaltar que los peces fueron aclimatados en tanques de 100 litros a 24 °C durante una semana antes de realizar el desafío, manteniendo esta temperatura durante todo el experimento. Las pruebas de virulencia se llevaron a cabo mediante inyección vía intraperitoneal de suspensiones bacterianas en solución salina (NaCl al 0,85%), empleando una dosis de $2,5 \times 10^6$ UFC/pez e infectando un total de 10 lubinas por cepa a ensayar. Además, la mortalidad de los peces se registró diariamente durante 8 días post-inoculación, sembrando en TSA-1 y TCBS muestras de riñones de los peces muertos, y confirmando las colonias obtenidas mediante la amplificación del gen *ureC* (Osorio *et al.*, 2000b).

Después de ocho días transcurridos tras al desafío con las diferentes cepas, pudimos observar que la cepa salvaje AVL49 mataba al 80% de las lubinas (Fig. IV.42). Por su parte, los valores de supervivencia registrados en el caso de los mutantes simples AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$) y AVL58 ($\Delta plpV$), mostraron un aumento de los mismos, alcanzando en ambos el 80% de peces supervivientes (Fig. IV.42). Con respecto al doble mutante para los genes *hlyA_{cr}* y *plpV* (AVL62), ningún deceso fue registrado (Fig. IV.42). A la vista de estos datos, podemos afirmar que PhlyC y PlpV contribuyen, aparentemente en la misma medida, a la virulencia en lubina de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* no portadoras del plásmido pPHDD1. No es de extrañar que la fosfolipasa PlpV contribuya a la virulencia en peces, dado que las fosfolipasas homólogas han exhibido su participación en la virulencia para peces en otras especies de patógenos. De este modo,

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la fosfolipasa PPP de la subespecie *piscicida* también mostró ser tóxica para peces, concretamente para cobia (Hsu *et al.*, 2013), la hemolisina termolábil TLH de *V. alginolyticus* exhibió ser virulenta para pez cebra (Jia *et al.*, 2010), y la hemolisina VHH de *V. harveyi* para platija y rodaballo (Sun *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2010). Por el contrario, la fosfolipasa PlA de *V. anguillarum* no parece contribuir a la virulencia en trucha arcoiris (Li *et al.*, 2013).

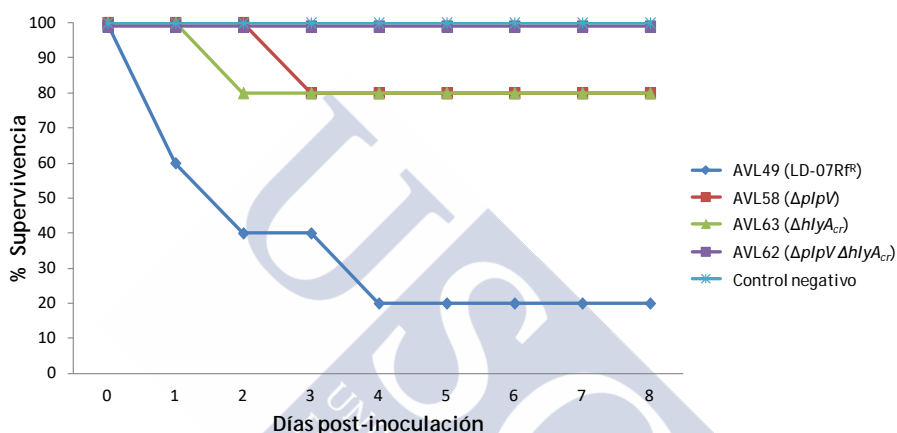


Fig. IV.42: Supervivencia (%) de lubinas tras inoculación intraperitoneal con la dosis de $2,5 \times 10^6$ UFC/pez de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* (\nexists pPHDD1) AVL49 y los mutantes simples (AVL63 y AVL58) y doble (AVL62). Empleamos como control peces inyectados con solución salina (n=10 peces por cepa).

En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo nos han permitido afirmar que la fosfolipasa PlpV, codificada en el cromosoma I, es la única responsable de las actividades fosfolipasa y hemolítica (en sangre de trucha) en cepas carentes de pPHDD1, y junto con la damselsina, de la actividad fosfolipasa presentada por las cepas portadoras de pPHDD1. Por otro lado, y como resultado muy relevante para el presente trabajo, PlpV contribuye junto con PhlyC, a la virulencia en lubina, quedando demostrado además, que son factores decisivos para la misma, al menos en el modelo animal y la dosis elegidos. El paradigma relativo a la función de las fosfolipasas bacterianas discutido en este trabajo está sesgado hacia sus papeles en la patogénesis. Sin embargo, estas enzimas también contribuyen a

otros aspectos de los estilos de vida de las bacterias, incluyendo la remodelación de las membranas y la competencia con otros microorganismos para la supervivencia en sus ambientes naturales y, por lo tanto, su naturaleza multifuncional refleja la notable adaptabilidad conferida por las fosfolipasas a algunas bacterias (Flores-Díaz *et al.*, 2016).



4.5. IDENTIFICACIÓN DE LA COLAGENASA COLP Y SU CONTRIBUCIÓN A LA VIRULENCIA EN *P. DAMSELA* SUBSP. *DAMSELA*

Las enzimas proteolíticas que hidrolizan los enlaces peptídicos en proteínas y péptidos, son esenciales para el control homeostático tanto en eucariotas como en procariotas, y por lo tanto, intervienen fisiológicamente en el ciclo de vida de los microorganismos. Sin embargo, en ocasiones, estas enzimas producidas por especies patógenas actúan como factores de virulencia para el hospedador (Harrington, 1996; Miyoshi, 2013). Un ejemplo de este tipo de enzimas son las colagenasas, enzimas que degradan los colágenos animales. Los colágenos pueden servir como sustratos biológicamente relevantes, ya que son los componentes proteicos predominantes de los tejidos de metazoos, incluidos los animales marinos (Park *et al.*, 2015). Tal y como hemos avanzado en el capítulo 4.2 de Resultados y Discusión, la comparación de genomas entre cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* portadoras y desprovistas de pPHDD1, reveló la presencia del gen *colP* (codificante para una posible colagenasa microbiana) en los dos aislados carentes del plásmido. Este hallazgo, sumado al hecho de que las colagenasas microbianas están fuertemente ligadas a la patogénesis bacteriana (Harrington, 1996; Matsushita & Okabe, 2001; Shinoda & Miyoshi, 2011), nos impulsó a iniciar un estudio en detalle acerca de esta capacidad enzimática, y de su posible implicación en la virulencia de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* no portadoras de pPHDD1.

4.5.1. No todos los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* presentan actividad gelatinasa

Dado que las colagenasas son a menudo importantes factores de virulencia, la detección de dicha actividad en los aislados bacterianos es una prueba relevante. Como el estudio de la hidrólisis de fibrillas de colágeno conlleva el empleo de kits comerciales o de sustratos específicos de gran coste para su uso habitual en los laboratorios de diagnóstico, de manera rutinaria en la identificación bioquímica bacteriana se analiza la degradación de la gelatina (proteína desnaturalizada derivada del colágeno animal) aportada directamente al medio de cultivo (Mc Faddin, 1993). Por ello, se procedió en primer

lugar a examinar dicha capacidad enzimática en las 49 cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* disponibles (Tabla III.1 de Material y Métodos). La detección del fenotipo gelatinasa se realizó mediante el crecimiento en placas de TSA-1 suplementadas con 3% de gelatina comercial (Oxoid), y posterior incubación durante 48 horas a 25 °C. El revelado de esta actividad se llevó a cabo añadiendo cloruro de mercurio al 12,5% (p/v) (sección 3.12.3.2.1 de Material y Métodos). El precipitado blanco indica la presencia de gelatina no hidrolizada, mientras que la ausencia del precipitado en la región de crecimiento bacteriano apunta a la hidrólisis de gelatina.

Como se puede apreciar en la Tabla IV.4 y en la Fig. IV.43, el 27% de los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* son capaces de degradar la gelatina aportada al medio de cultivo. Holt *et al.* (1994) establecieron el porcentaje de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* gelatinasa positivas entre el 26-76%. En este sentido, unos pocos estudios han detectado actividad gelatinolítica en *P. damsela* subsp. *damsela*, y únicamente en una pequeña fracción de los aislados: el 6% de los analizados por Labella *et al.* (2010a), o el 19% y el 46% de las cepas aisladas de trucha arcoiris por Pedersen *et al.* (1997) y Pedersen *et al.* (2009), respectivamente. Si bien es cierto que hay algún ejemplo en el que el 100% de los aislados fueron positivos (Grimes *et al.*, 1984b; Fujioka *et al.*, 1988; Khouadja *et al.*, 2014), la mayoría de los estudios hallaron aislados negativos para este carácter (Vera *et al.*, 1991; Fouz *et al.*, 1991; Fouz *et al.*, 1992; Fouz *et al.*, 1993; Renault *et al.*, 1994; Lozano-León *et al.*, 2003; Kanchanopas-Barnette *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Abdel-Aziz *et al.*, 2013; Hassanzadeh *et al.*, 2015).

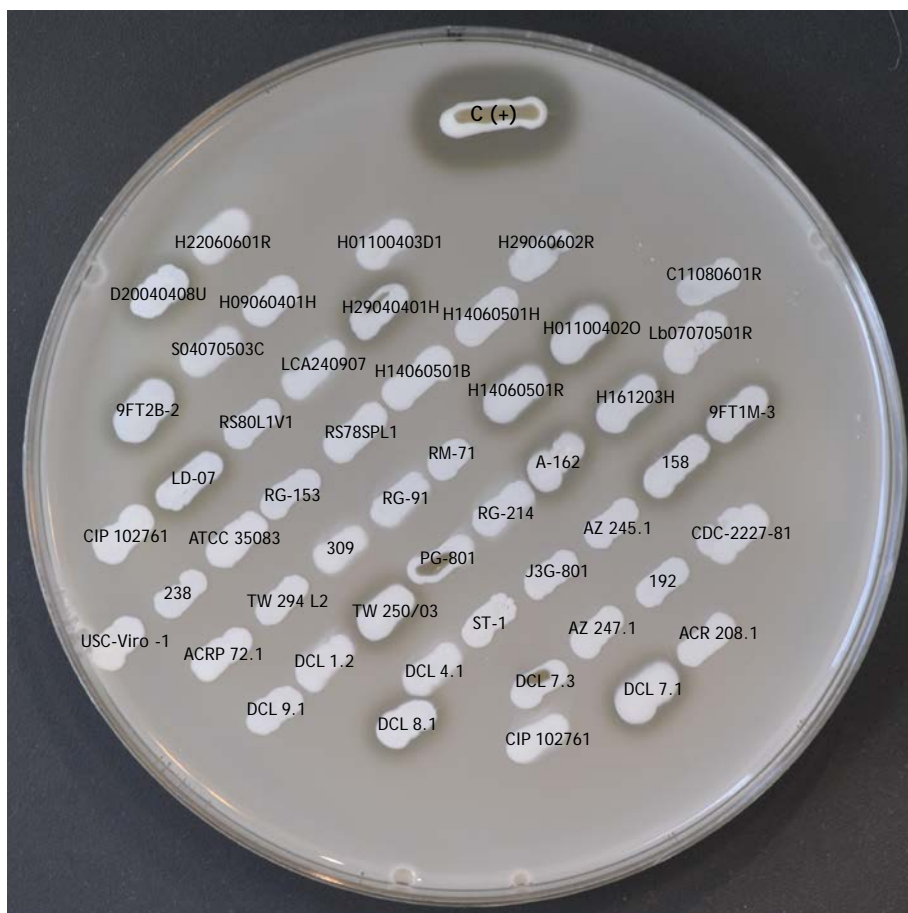


Fig. IV.43: Detección de la actividad gelatinasa en 49 aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* en placas de TSA-1 suplementadas con 3% de gelatina, tras incubación durante 48 horas a 25 °C. La gelatina no hidrolizada precipitará en la placa al añadir cloruro de mercurio. En cambio, alrededor de las cepas gelatinasa (+) aparecerá un halo translúcido debido a la hidrólisis de la gelatina. Control positivo: *Vibrio anguillarum* R82.

Asimismo, en base a los resultados obtenidos, no se ha podido establecer una correlación entre la degradación de la gelatina y la fuente de aislamiento o el origen geográfico. Además, los aislados gelatinasa positivos muestran representantes tanto entre el grupo de cepas con pPHDD1 como entre el grupo sin plásmido (Tabla IV.4).

Destacamos por lo tanto, que las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* tienen carácter variable en cuanto a la actividad gelatinasa, y que ésta es independiente de la presencia o ausencia del plásmido pPHDD1.

Un dato muy curioso con el que nos topamos al identificar bioquímicamente la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* mediante el sistema API 20E, fue el hecho de que la actividad gelatinasa registrada anteriormente en placas de TSA-1 suplementadas con gelatina, no era detectada por este sistema miniaturizado tras su incubación durante 24 o 48 horas (Fig. IV.44). Esta diferencia podría ser debida, tal vez, a que la cantidad de enzima que se ha producido en ese periodo de incubación no sea la suficiente para que la reacción sea detectada por ese sistema de identificación diseñado para clínica humana.



Fig. IV.44: Resultado de la identificación bioquímica de la cepa gelatinasa positiva LD-07 (A) y la cepa gelatinasa negativa RM-71 (B) de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* utilizando el sistema API 20E, tras 24 horas de incubación. La flecha verde señala el pocillo destinado a la detección de la actividad gelatinasa.

4.5.2. Todas las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* con actividad gelatinasa presentan el gen *colP*

Como ya se ha mencionado, el análisis comparativo de cuatro genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* reveló la presencia de un gen candidato, potencial codificador de una colagenasa microbiana, al que denominamos *colP* (colagenasa de *Photobacterium*). Curiosamente, el gen *colP* fue detectado en el cromosoma I de los genomas de las cepas LD-07 y A-162 carentes de pPHDD1, estando ausente en las cepas portadora de dicho plásmido virulento CIP 102761 y RM-71. Dado que las cepas LD-07 y A-162 son gelatinasas positivas, mientras que CIP 102761 y RM-71 son negativas para este carácter (Fig. IV.43; Tabla IV.4), decidimos considerar a ColP como la enzima candidata responsable del fenotipo gelatinasa detectado en *P. damsela* subsp. *damsela*.

El primer paso a seguir en el estudio pormenorizado de *colP*, fue el de establecer si existía una correlación entre la capacidad de hidrolizar gelatina y la presencia del gen *colP*. Para ello, amplificamos por PCR la región interna del gen *colP* empleando los cebadores diseñados sobre el genoma de LD-07: *chequeo_colP_F* y *chequeo_colP_R* (Fig. IV.46A; Tabla III.4 de Material y Métodos). Mediante esta reacción en cadena de la polimerasa, pudimos confirmar que todas las cepas que degradaban la gelatina del medio poseen en su genoma el gen *colP*. Por el contrario, las cepas sin dicha capacidad enzimática carecen del mismo (Fig. IV.46B1; Tabla IV.4).

Una vez establecida la correlación entre actividad gelatinasa y presencia del gen *colP*, la siguiente cuestión que decidimos abordar fue la de saber si éste se situaba en la misma región genómica en todas las cepas gelatinasa positivas. Primeramente, al analizar el contexto genético de *colP* en los genomas de LD-07 y A-162, percibimos que en ambos casos este gen se circunscribía a la misma región del cromosoma I, hallándose flanqueado por los genes de la subunidad II de la NADH deshidrogenasa y TusA (tRNA 5-metilamino metil-2-tiouridina sintasa), también presentes en las cepas gelatinasa negativas CIP 102761 y RM-71 (Fig. IV.45). Posteriormente, con el fin de conocer la ubicación genética de *colP* en el resto de las cepas con actividad gelatinasa, amplificamos mediante PCR la región adyacente

a *colP* mediante el uso de los cebadores *entorno_colP_F* y *entorno_colP_R* (Fig. IV.46A; Tabla III.4 de Material y Métodos). Al igual que la mayoría de los genes que codifican estas enzimas en otras especies bacterianas, aunque algunos de ellos están presentes en elementos genéticos móviles (Flores-Díaz *et al.*, 2016), *colP* se localiza en el cromosoma I en un contexto genético idéntico en todas las cepas gelatinasa positivas. Dicho contexto genético constituye una región invariable (es decir, conservada) en las cepas sin capacidad gelatinasa de *P. damsela* subsp. *damsela* analizadas (Fig. IV.46B2).

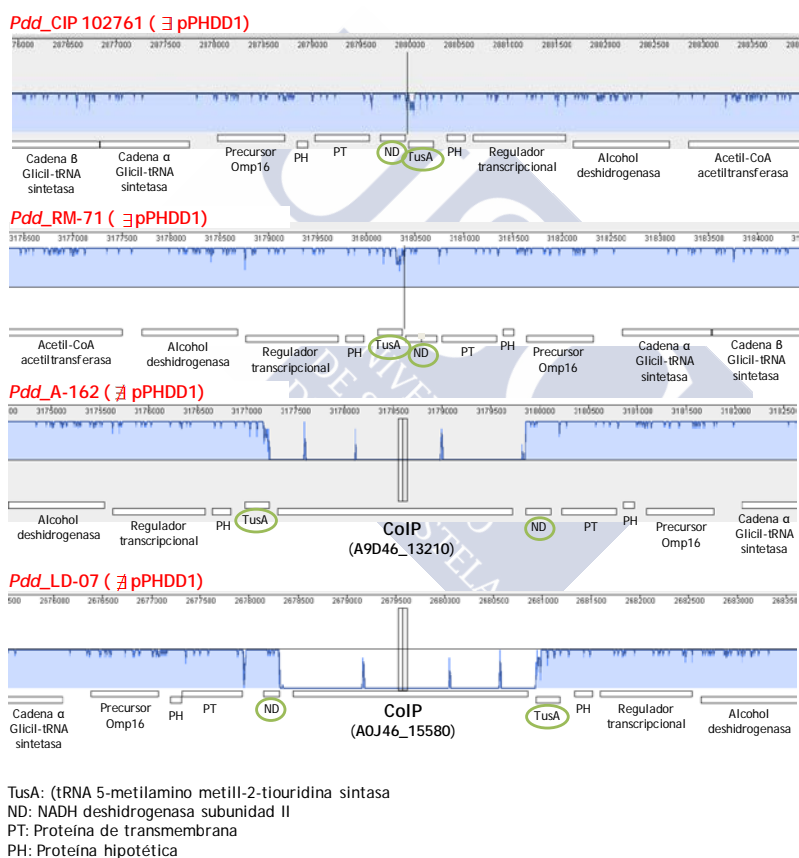


Fig. IV.45: Alineamiento de los genomas indicados de *P. damsela* subsp. *damsela* mediante el programa MAUVE. Se muestra la localización y contexto genético de las colagenasas A9D46_13210 y A0J46_15580 presentes en las cepas sin plásmido A-162 y LD-07, respectivamente, así como la misma localización en las cepas CIP 102761 y RM-71 gelatinasas negativas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

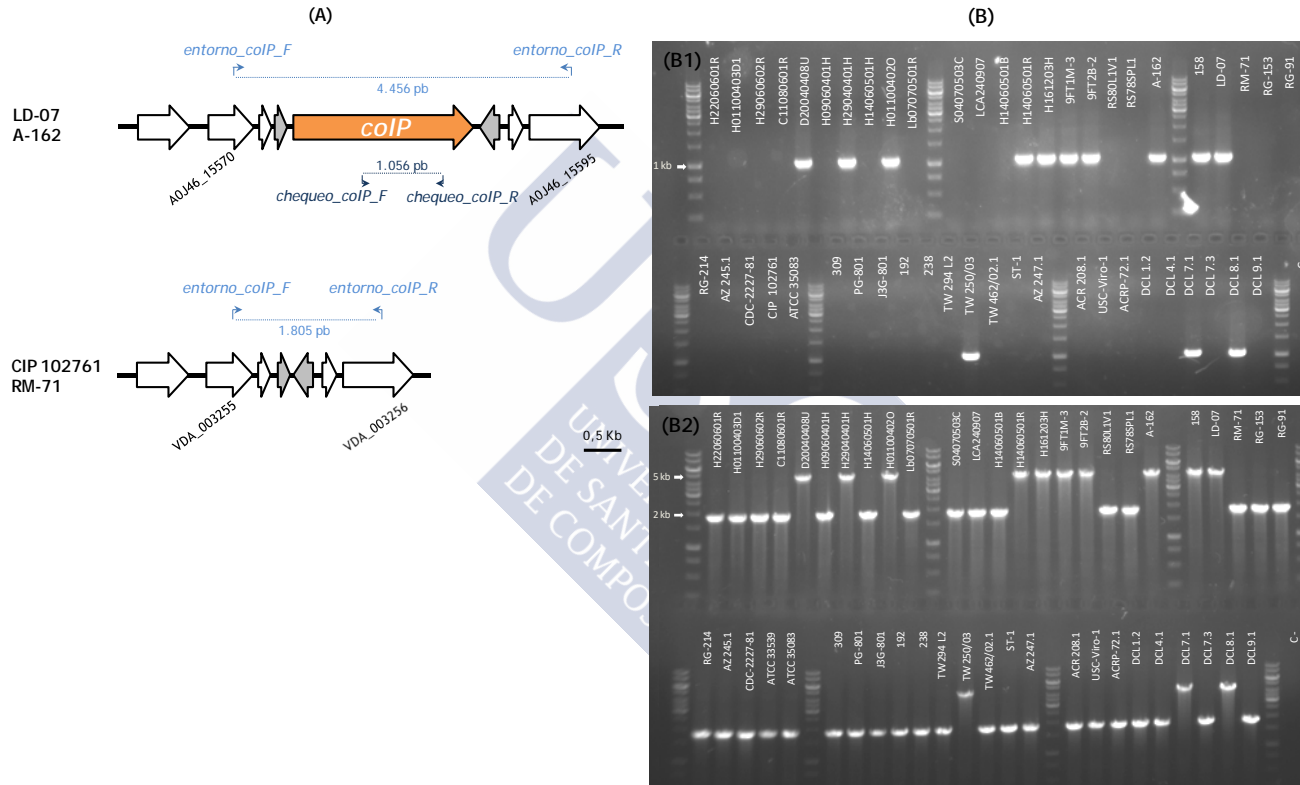


Fig. IV.46: (A) Contexto genético de *colP* (A0J46_15580) en las cepas *colP*-positivas LD-07 y A-162, y su comparación con la misma región genómica en las cepas *colP*-negativas CIP 102761 y RM-71 (Los códigos de proteínas corresponden a la cepa LD-07 y CIP 102761, respectivamente). (B) Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR obtenidos tras amplificar 49 cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* con los cebadores de chequeo de *colP* (B1) y entorno de *colP* (B2).

4.5.3. ColP muestra homología con colagenasas de la familia *Vibrionaceae*

Como ya hemos podido constatar en la introducción, durante los últimos años, numerosas colagenasas han sido localizadas en diversas especies bacterianas. La búsqueda de enzimas colagenolíticas homólogas a ColP mediante el servidor BLASTP, evidenció su similitud con toda una serie de enzimas colagenolíticas, tales como: peptidasas M9 de *Photobacterium ganghwense* (47% identidad; 99% cobertura), *P. galathea* (46%; 99%), *Vibrio navarrensis* (44%; 99%), *P. halotolerans* (45%; 98%), *V. ordalii* (44%; 97%) y *V. crassostreae* (44%; 97%); proteínas no caracterizadas de *P. jeanii* (45%; 99%), *P. swingsii* (46%; 99%), *P. sanguinancreri* (46%; 99%), *Aliivibrio wodanis* (46%; 94%) y *Aliivibrio logei* (47%; 94%); y colagenasas microbianas de *V. vulnificus* (45%; 99%), *V. fluvialis* (45%; 99% de), *V. lentus* (43%; 99%), *V. parahaemolyticus* (colagenasa PrtV; 43%; 99%), *V. harveyi* (44%; 98%), *V. mimicus* (colagenasa VMC; 45%; 98%), *V. cholerae* (colagenasa VchC; 43%; 98%), *V. anguillarum* (44%; 97%), *V. alginolyticus* (colagenasa VAC; 31%; 82%), *V. parahaemolyticus* (colagenasa VppC; 33%; 81%) y *Grimontia hollisae* (anteriormente *Vibrio hollisae*) (colagenasa VHC 34%; 67%), entre otras.

Se realizó un análisis filogenético empleando el método Neighbor-Joining (1000 bootstraps) con los homólogos proteicos aportados por BLASTP, e incorporando además, colagenasas perfectamente descritas en especies del género *Clostridium* (Matsushita *et al.*, 1994; Yoshihara *et al.*, 1994; Matsushita *et al.*, 1999; Eckhard *et al.*, 2013). Además, se enraizó el árbol filogenético con la colagenasa de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (Seshadri *et al.*, 2006). Así, como podemos advertir en el dendrograma de la Fig. IV.47, las colagenasas de la familia *Vibrionaceae* se clasifican perfectamente en un grupo independiente al establecido para las enzimas del género *Clostridium* (bootstraps de 99 y 100, respectivamente). Si bien es cierto que principalmente las enzimas de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Aliivibrio* se recopilan en conjuntos distintos (bootstraps de 100, 99 y 100, respectivamente), la enzima ColP no está clasificada junto con las del género

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Photobacterium, sino que se encuentra agrupada con un valor de bootstrap de 52, con *Aliivibrio* sp., y con un número de sustituciones por sitio mayor que el de sus homólogos. Asimismo, llama nuestra atención el hecho de que la collagenasa VHC de *Grimontia hollisae*, VAC de *V. alginolyticus* y VppC de *V. parahaemolyticus* se agrupan independientemente del resto de la familia *Vibrionaceae*.

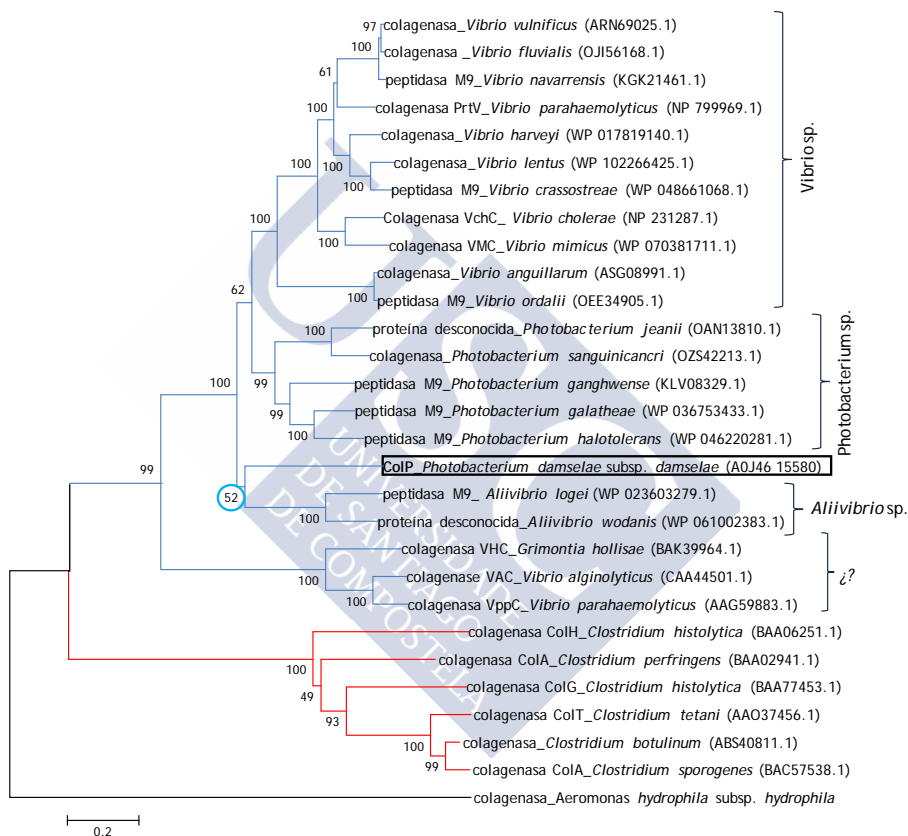


Fig. IV.47: Comparación de secuencias aminoacídicas que representa la relación filogenética de la colagenasa ColP de *P. damsela* subsp. *damsela* con enzimas relacionadas. El árbol filogenético se construyó empleando el método Neighbor-joining (1000 bootstraps) y el programa bioinformático MEGA 6. Se empleó como grupo externo la colagenasa de *Aeromonas hydrophila* (ABK384630.1). En la figura se muestran los números de acceso en GenBank de las proteínas. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

Este análisis nos permite afirmar la existencia de una estrecha relación filogenética entre la colagenasa ColP de *P. damsela* subsp. *damsela* y enzimas colagenolíticas estudiadas en profundidad del género *Vibrio*, como PrtV de *V. parahaemolyticus*, VchC de *V. cholerae*, VMC de *V. mimicus*, VAC de *V. alginolyticus*, VppC de *V. parahaemolyticus* o VHC de *Grimontia hollisae* (más abajo, Tabla IV.8).

4.5.4. Análisis *in silico* de ColP: enzima de la familia de las metaloproteasas M9

El gen *colP* consta de un total de 2.400 pb, cuya proteína ColP predicha posee 800 aminoácidos con una masa teórica de 90,46 kDa y pI de 5,20 (Stothard, 2000). Acorde con la clasificación de la base de datos de peptidasas MEROPS (Rawlings *et al.*, 2016) y PFam (PF01752), ColP pertenece a la familia M9 de las metaloproteasas y, más concretamente, a la clase M9A. La predicción de la estructura secundaria de ColP (67% de cobertura y 100% de confianza) realizada con el servidor Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015), el cual empleó como modelo la colagenasa ColG de *Clostridium histolyticum* (Eckhard *et al.*, 2011), reveló que esta enzima, al igual que la de referencia, exhibe una estructura en forma de silla de montar (Fig. IV.48). Debemos destacar que la representación estructural de ColP no retrata toda la molécula, sino que la estructura mostrada comprende los residuos Thr₂₄ y Glu₅₇₈. La aleta de montura N-terminal más pequeña está formada por hélices- α , mientras que la otra aleta posee láminas- β y hélices- α (Fig. IV.48A). Conectando ambas aletas, nos encontramos con un puente rico en glutamina, en contraste con ColG, que es rica en glicina (Fig. IV.48A).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

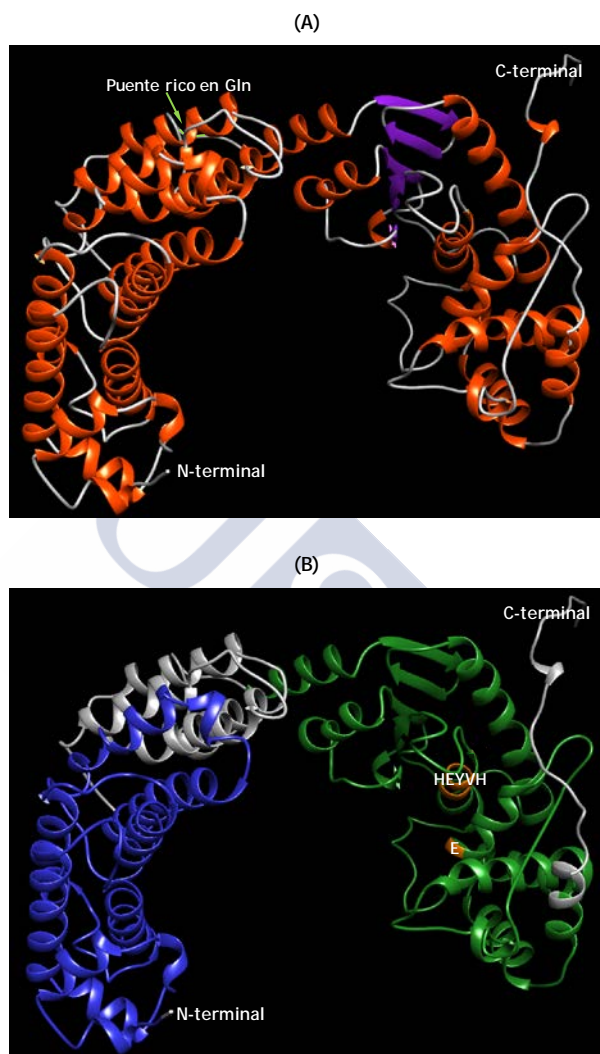


Fig. IV.48: (A) Estructura secundaria predicha para ColP, empleando como molde ColG de *Clostridium histolyticum* (PDB 2Y50) mediante el servidor Phyre2 y editado con Chimera. En naranja se señalan las hélice- α y en magenta las lámina-B. (B) Señalización de los dominios proteicos de ColP predichos mediante el servidor SMART (Letunic & Bork, 2017). El dominio activador se indica en color azul y el dominio catalítico o peptidasa en verde. En la representación se muestra la proteína comprendida entre los aminoácidos Thr₂₄ y Glu₅₇₈, por lo que no se visualiza ni el péptido señal ni el dominio pre-peptidasa PCC. En gris se evidencian las regiones entre dominios. En color anaranjado se marca el motivo conservado de unión a zinc (HEYVH-E).

Tal y como acabamos de describir, la enzima ColP forma parte de las metaloproteasas. Las metaloproteasas, junto con las aspártico, cisteína y serina proteasas, constituyen las denominadas enzimas proteolíticas. Este tipo de enzimas se caracterizan entre otras propiedades, por contener muchas de ellas un ion de zinc en el centro catalítico (Hooper, 1994; Duarte *et al.*, 2014). A ese respecto, los avances en biología molecular han proporcionado abundante información sobre las secuencias aminoacídicas de las metaloproteasas, revelando el motivo conservado HEXXH como el responsable de la unión a zinc, y por lo tanto, imprescindible para el funcionamiento de la enzima (Park *et al.*, 2015). Con respecto a la metaloproteasa ColP, el análisis comparativo con las enzimas homólogas de *Vibrio* spp. descritas en la literatura, reflejó la presencia del motivo conservado HEXXH (Fig. IV.49). Más en detalle, ColP muestra la secuencia conservada HEXXH-E (Fig. IV.49A), característica de la subfamilia de gluzincina, perteneciente a la familia de las metalopeptidasas M9 de MEROPS, agrupada en la superfamilia zincina (Valle & Auld, 1990; Hooper, 1994; Lee *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Rawlings *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2014).

Como ya se ha explicado anteriormente en la introducción, la base de datos MEROPS divide a las metaloproteasas de la familia M9 en M9A y M9B, dependiendo de si se trata de enzimas de *Vibrio* spp. o *Clostridium* spp., respectivamente. Teniendo presente que *Photobacterium* y *Vibrio* son miembros de la familia *Vibrionaceae*, y de que ColP agrupaba perfectamente con el resto de los miembros de ésta (Fig. IV.47), consideramos que ColP forma parte de la subfamilia de peptidasas M9A. A su vez, la subfamilia M9A se subdividió en tres clases atendiendo a toda una serie de atributos, tales como la secuencia de unión a zinc HEXXH-E (Tabla I.5 de Introducción). A este respecto, ColP exhibe la secuencia de unión a zinc HEYVH-E (posiciones 429-433 y 459), típica de la clase III, al igual que las colagenasas VHC de *Grimontia hollisae* (Teramura *et al.*, 2011), VppC de *V. parahaemolyticus* (Kim *et al.*, 2002) y VAC de *V. alginolyticus* (Takeuchi *et al.*, 1992) (Fig. IV.49B). Por el contrario, el análisis filogenético de la colagenasa de *P. damsela* subsp. *damsela* junto con el resto de homólogas de *Vibrio* spp., muestra una

mayor relación filogenética con las enzimas de la clase II, al estar agrupadas con las collagenasas VMC de *V. mimicus* (Lee *et al.*, 1998), VchC de *V. cholerae* (Park *et al.*, 2015) y PrtV de *V. parahaemolyticus* (Yu & Lee, 1999). Ante estos datos, no es de extrañar que en el análisis filogenético mostrado en la Fig. IV.47, las collagenasas identificadas ahora como de clase III, agrupasen de manera independiente a las de clase II. A pesar de ello, Teramura *et al.* (2011) consideran que las collagenasas de clase II y III, que difieren en función y origen, están relacionadas evolutivamente. Si bien hemos incluido a enzimas de la clase I en este análisis filogenético, éstas carecen de relevancia para nuestro estudio ya que se corresponden con las denominadas termolisinas, y solo son consideradas como collagenasas verdaderas las de clase II y III.

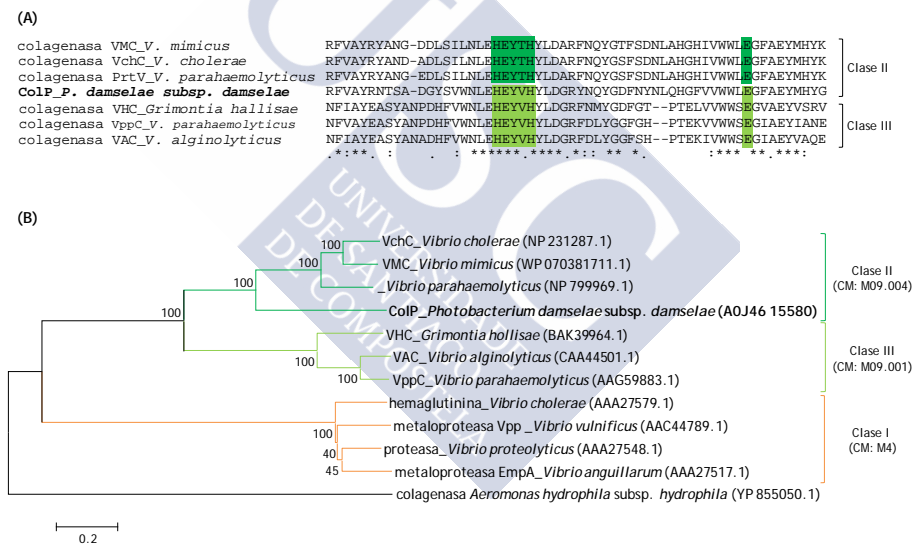


Fig. IV.49: (A) Alineamiento de secuencias múltiples del centro catalítico de metaloproteasa de *Vibrio* de la clase II y clase III. El recuadro de la izquierda muestra el motivo HEXXH, y el recuadro de la derecha indica el residuo de glutamato. En verde oscuro se resalta el motivo típico de la clase II y en verde claro el de la clase III. (B) Dendrograma de metaloproteasas de *Vibrio*, en base a la secuencia aminoacídica, construido con el software MEGA 6. Los números de acceso de las metaloproteasas mostradas aparecen indicados al lado del nombre de cada especie bacteriana. El tamaño de las ramas es dibujado a escala proporcional al número de cambios aminoacídicos. En cada nodo se muestran los valores de bootstrap. (CM) código MEROPS.

En general, las colagenasas de *Vibrio* son proteínas multidominio que contienen un péptido señal, un dominio peptidasa M9N (dominio activador) y un dominio peptidasa/catalítico M9, pudiendo llegar a presentar además, un dominio similar a la enfermedad renal poliquística (PKD), y/o un dominio(s) C-terminal prepeptidasa bacteriana (Duarte *et al.*, 2014). El análisis *in silico* de los dominios proteicos de ColP a través de los servidores Pfam y SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*; Letunic *et al.*, 2008), predijo la existencia de un péptido señal de 21 residuos de longitud (confirmado por SignalP), un dominio activador, un dominio catalítico o peptidasa y un dominio pre-peptidasa C-terminal o PCC (Fig. IV.50). Si bien los servidores Pfam y SMART solo han localizado un único dominio PCC, el alineamiento aminoacídico con las colagenasas VchC de *V. cholerae*, PrtV de *V. parahaemolyticus* y VHC de *Grimontia hollisae*, ha revelado la existencia de dos dominios PCC (Fig. IV.50).

Al comparar la predicción de los dominios proteicos con la estructura predicha de ColP, vemos que estos dominios se encuentran estructuralmente organizados de modo independiente, sugiriendo una cierta flexibilidad durante el reconocimiento del sustrato y catálisis, al igual que lo establecido para la colagenasa ColAh de *Aeromonas piscicola* (Duarte *et al.*, 2014). Es decir, el dominio activador se localiza en la aleta de montura N-terminal, mientras que el dominio catalítico está representado en el otro lateral de la silla (Fig. IV.48B). Debemos destacar que el modelo estructural no incluye ni el péptido señal ni el dominio PCC, dado que este último está ausente en la estructura de referencia empleada por el servidor Phyre2, y el péptido señal no se halla en la proteína madura. Por añadidura, contrastando los dominios de ColP con el resto de las colagenasas de *Vibrio* spp., detectamos más semejanza en la organización de los dominios de las enzimas de clase II (Fig. IV.50; Tabla IV.8).

Debido a que actualmente no se ha llegado a cristalizar ninguna colagenasa de *Vibrio* spp., aún no está claro cómo este tipo de colagenasas reconocen y degradan el colágeno. A este respecto, Lee *et al.* (2005) relacionaron dos motivos FAXWXXT en el extremo C-terminal de VMC de *V. mimicus* de clase II con la unión a colágeno, siendo el segundo de ellos el más conservado y el de mayor

relevancia. El alineamiento aminoacídico de estos motivos conservados de ColP con las distintas collagenasas, ha mostrado una mayor conservación del primero de los motivos en las de clase II (Fig. IV.50B). Con respecto al segundo de los motivos, éste es conservado tanto en la clase II como en la clase III. Asimismo, la pérdida de 100 aminoácidos desde el extremo C-terminal resultó en la pérdida de la actividad gelatinasa en VMC de *V. mimicus*. En cambio, la delección de 67 residuos desde el extremo C-terminal no (Lee *et al.*, 2003). Por el contrario, hasta ahora no se ha demostrado que el dominio similar a PKD ni el dominio PPC de las collagenasas de clase III funcionen como un dominio de unión a colágeno (Zhang *et al.*, 2015).

Como se ha comentado al inicio de esta sección, la masa predicha para ColP es de 90,46 KDa. Una de las características distintivas de las clases II y III es la masa molecular de sus proteínas maduras, las cuales no dejan de ser un reflejo de la organización de sus dominios. De ese modo, las collagenasas de clase II presentan valores que oscilan entre los 66 y 61 KDa (no poseen el dominio PKD), más bajos que los de las collagenasas de clase III con 82 KDa de peso molecular (Tabla IV.8). En base a esto se podría clasificar a ColP como una collagenasa de clase III, pero un dato muy llamativo es la diferencia existente entre los pesos moleculares predichos y los presentados por las proteínas maduras (Tabla IV.8). Las proteasas extracelulares bacterianas a menudo se someten a múltiples etapas de escisión proteolítica que conducen a la conversión de una pre-proenzima (forma inactiva) en una proteína madura (Wandersman, 1989). Curiosamente, Park *et al.* (2015) demostraron que la collagenasa VchC madura de 66 KDa perdía los dos dominios PCC tras un procesamiento extracelular promovido por la presencia de un factor(s) adicional(es), así como la eliminación del péptido señal durante el transporte de la proteasa a través de la membrana interna. Incluso se ha llegado a especular que la eliminación de ambos dominios PPC expone los motivos FAXWXXT, proporcionando una mejor interacción con el sustrato (Park *et al.*, 2015). De igual modo, Teramura *et al.* (2011) y Lee *et al.* (1998) consideraron que VHC de *Grimontia hollisae* y VMC de *V. mimicus* respectivamente, podrían experimentar un proceso similar después de su secreción. En base a estos datos, no sería de extrañar que ColP

sufra un procedimiento similar y pierda los dominios prepeptidasas en el medio extracelular, resultando en una proteína madura con una masa molecular similar a las de las collagenasas de clase II.

En definitiva, el análisis *in silico* de la collagenasa ColP producida por algunas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, sugiere que estamos ante una metaloproteasa M9 de clase II (según la relación filogenética y la organización de sus dominios y) o de clase III (según el motivo de unión a zinc), y que como tal, debería ser considerada como una collagenasa verdadera. Para poder corroborar tal afirmación, será necesario llevar a cabo una serie de ensayos enzimáticos que se describirán a continuación.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

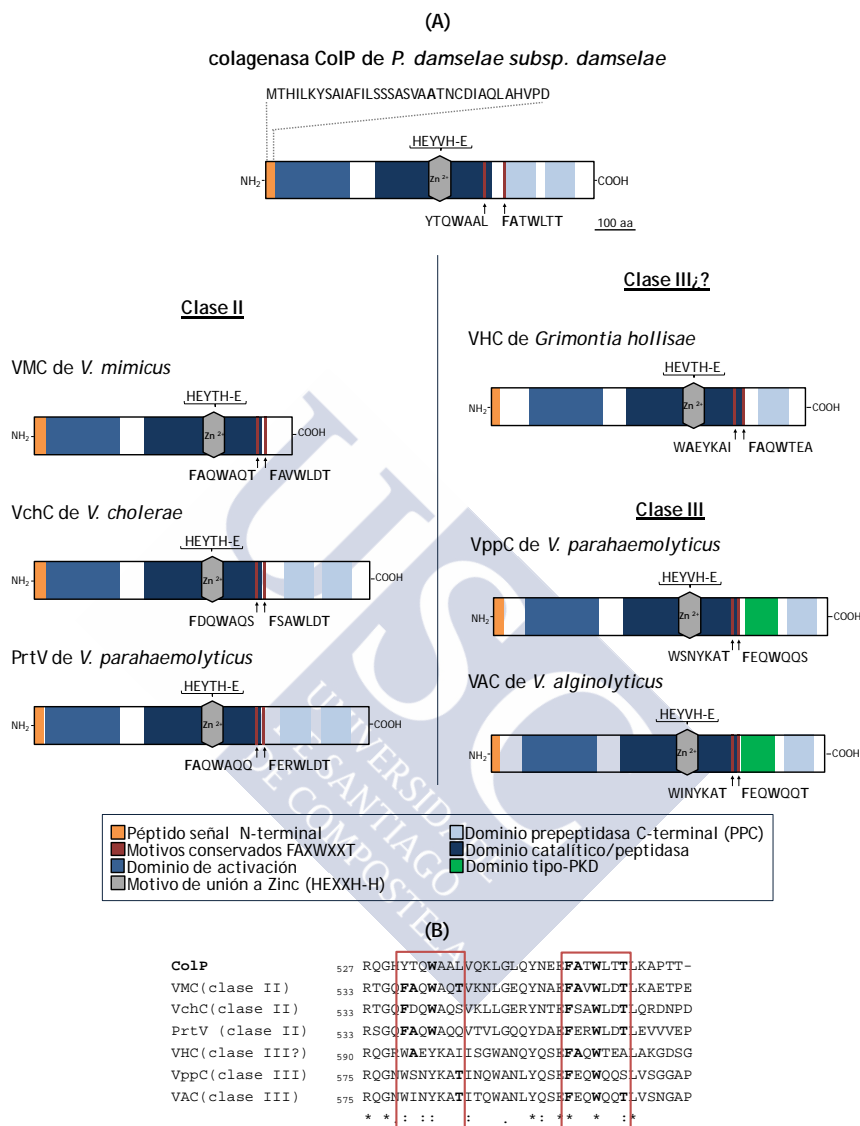


Fig. IV.50: (A) Representación esquemática de los dominios proteicos de las colagenas ColP de *P. damsela* subsp. *damsela*, VMC de *V. mimicus*, VchC de *V. cholerae*, PrtV de *V. parahaemolyticus*, VHC de *Grimontia hollisae*, VppC de *V. parahaemolyticus* y VAC de *V. alginolyticus*. Predicción de dominios llevada a cabo mediante el servidor SMART, Pfam y estudios respectivos (Tabla IV.8). La barra de escala representa 100 aminoácidos de longitud. (B) Alineamiento aminoacídico de los motivos FAXWXT en las colagenas de clase II y III de *Vibrio* spp. analizadas. En negra se marcan las posiciones conservadas.

Tabla IV.8: Colagenasas verdaderas de *Vibrio* spp. analizadas en profundidad en previos estudios y homólogos a la enzima ColP de *P. damsela* subsp. *damsela* (Pdd). (PS) péptido señal.

Enzima (Código acceso NCBI)	Especie productora	Características (% identidad/ cobertura)	Clases de la familia Mga (motivo conservado)	Domínios proteicos	Secretada/ Termolábil	Expresada en E. coli / PS predicho	Actividad gelatinasas/gelatinolítica y otras	Virulencia	Referencias
ColP (A0J46_15500)	Pdd	- 2.400 pb - 800 aa - 90,46 KDa proteína predicha	Clase II? (HEYVH-H)	- Péptido señal - Dominio activador - Dominio catalítico - 2 dominios prepeptidasa (PCC)	SI/SI	SI/SI	- Gelatina - Péptido sintético FALGPA - No caseína	Virulencia en lubina	El presente trabajo
VchC (VC_1650)	V. cholerae	- 2.454 pb - 818 aa - 93 KDa proteína predicha - 66 KDa proteína madura - (43% id.; 98% cob.)	Clase II (HEYTH-H)	- Péptido señal - Dominio activador - Dominio catalítico - 2 dominios prepeptidasa (PCC)	SI (SST2)/SD	SI/ SI	- Gelatina - Péptido sintético FALGPA - Colágeno tipo I de piel de pez	Empleo de colágeno como única fuente de carbono y nitrógeno No afecta a la colonización y transmisión intestinal en ratón y pez cebra	Park et al. (2015)
VmC (NP_07038171 1.1)	V. mimicus	- 2.418 pb - 806 aa - 91,49 KDa proteína predicha - 61 KDa proteína madura - (45% id.; 98% cob.)	Clase II (HEYTH-H)	- Péptido señal - Dominio activador - Dominio catalítico	SI/SI	SI/SI	- Gelatina - Colágenos tipo I, II y III - Péptidos sintéticos: Z- GPGPA y Z-GFLOP - No caseína	SD	Lee et al. (1998) Shin et al. (2000) Lee et al. (2003)
PrxV (NP_799969.1)	V. parahaemolyticus	- 2.448 pb - 816 aa - 91,46 KDa proteína predicha - 62 KDa proteína madura - (43% id.; 99% cob.)	Clase II (HEYTH-H)	- Péptido señal - Dominio activador - Dominio catalítico - 2 dominios prepeptidasa (PCC)	SI/SI	SI/SI	- Gelatina - Colágenos tipo I, II, III, IV - Péptido sintético FALGPA - No colágeno tipo V - No caseína	SD	Lee et al. (1995) Yu & Lee (1999) Yu et al. (2000)
VhC (BAK39964.1)	Grimontia hollisae	- 2.301 pb - 767 aa - 84,43 KDa proteína predicha - 60 KDa proteína madura - (34% id.; 67% cob.)	Clase III? (HEYVH-H)	- Péptido señal - Dominio activador - Dominio catalítico - 2 dominios prepeptidasa (PCC)	SI/ SD	SI/SI	- Gelatina - Colágeno tipo I - Péptido sintético FALGPA - No caseína	SD	Teramura et al. (2011)
VmC (CAA44501.1)	V. alginolyticus	- 2.442 pb - 814 aa - 89,98 KDa proteína predicha - 82 KDa proteína madura - (31 % id.; 82% cob.)	Clase III (HEYVH-H)	- Péptido señal - Dominio activador - Dominio catalítico - Dominio PKD - Dominio prepeptidasa (PCC)	SD/SD	SD/SD	- Colágeno tipo I - Gelatina - Caseína - No degrada FALGPA	Relacionan el gen de la colagenasa con cepas virulentas	Takeuchi et al. (1992) Yu et al. (2000) Yishan et al. (2011)
VppC (AAG59883.1)	V. parahaemolyticus	- 2.442 pb - 814 aa - 89,85 KDa proteína predicha - 82 KDa proteína madura - (33% id.; 81% cob.)	Clase III (HEYVH-H)	- Péptido señal - Dominio activador - Dominio catalítico - Dominio PKD - Dominio prepeptidasa (PCC)	SI/SI	SI/SI	- Colágenos tipo I, II, III, IV - Gelatina - Caseína - Péptido sintético Z- GPGPA	Virulencia en pez cebra	Kim et al. (2002) Luan et al. (2007)

4.5.5. ColP: colagenasa de clase II responsable de la hidrólisis de gelatina presentada por ciertas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*

Hasta el momento, hemos relacionado el gen *colP* con la capacidad de hidrolizar gelatina presentada por diversas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, pero tal hipótesis todavía no ha sido contrastada. Para ello, se construyó en primer lugar un mutante por intercambio alélico de *colP* (AVL60) en la cepa AVL49. Los cebadores destinados a la construcción del mutante AVL60 (LD-07Rf^R $\Delta colP$) se muestran en la Tabla III.6 (ver Material y Métodos). Una vez obtenido dicho mutante, visualizamos su actividad proteasa en placas de TSA-1 suplementadas con gelatina al 3% (Fig. IV.51). Tras 48 horas de incubación a 25 °C, se procedió al revelado de la actividad gelatinolítica a través de la adición de cloruro de mercurio al 12,5% (p/v).

Como se puede apreciar en la Fig. IV.51, la delección de *colP* en la cepa AVL49 (\nexists pPHDD1), conllevó la pérdida de la capacidad de hidrolizar la gelatina aportada al medio de cultivo. Para poder asegurar que el fenotipo observado se debía únicamente a la delección del gen *colP* y no a efectos polares u otras causas, se procedió a complementar la cepa mutante con el alelo salvaje. Para ello, se amplificó mediante PCR el gen *colP* completo incluyendo su promotor nativo (ver cebadores en Tabla III.7 de Material y Métodos) y se clonó en el vector pBBR1-MCS5 (Kovach *et al.*, 1995). Al complementar el mutante AVL60 (LD-07Rf^R $\Delta colP$) con el plásmido pAVL484 (plásmido pBBR1-MCS5 que contiene el gen *colP* y su promotor), se restauró el fenotipo proteolítico mostrado por la cepa parental (Fig. IV.51). En conjunto, estos resultados indican claramente que la actividad gelatinasa manifestada por algunas cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* es ejercida por la acción hidrolítica de la enzima ColP.

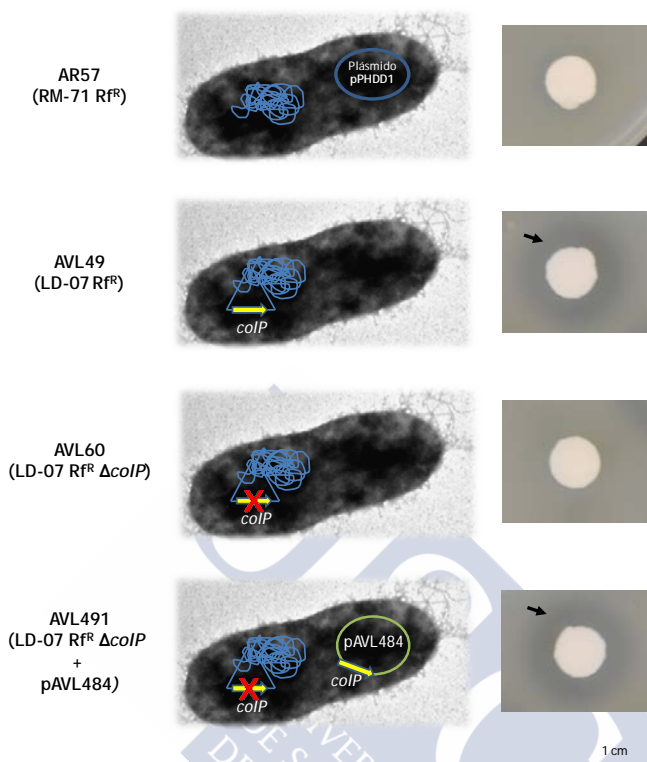


Fig. IV.51: Fenotipos gelatinasa de la cepa AR57 (\exists pPHDD1), AVL49 (\nexists pPHDD1), del mutante simple AVL60 ($\Delta colP$) y de su cepa complementada AVL471 ($\Delta colP$ + pBBR1-MCS5-*colP*), de *P. damsela* subsp. *damsela* en placas de gelatina al 3%, después de 48 horas de incubación a 25 °C. Las flechas negras señalan el halo de degradación de gelatina. La barra de escala representa 1 cm.

En otro orden de ideas, una de las características diferenciales entre las clases II y III de las colagenasas de *Vibrio* spp., es la capacidad de hidrolizar caseína, siendo solo positivas para este fenotipo las últimas (Tabla IV.8). La caseína, fosfoproteína presente en la leche y derivados, es el sustrato más común para la detección de actividad proteasa no específica en bacterias (Yu *et al.*, 2000). Dado que el análisis *in silico* previo nos ha llevado a clasificar a ColP como una enzima colagenolítica de clase II, y por lo tanto, no debería presentar capacidad caseinasa, decidimos corroborar tal fenotipo. Para ello, en primer lugar evaluamos la actividad proteolítica en los 49 aislados disponibles en el cepario del laboratorio mediante

crecimiento en placas de TSA-1 suplementadas con leche desnatada al 4% (sección 3.12.3.1 de Material y Métodos). Aquellas cepas con capacidad de hidrolizar caseína, manifestarán un halo translúcido a su alrededor (Fig. IV.52). Los resultados obtenidos mostrados en la Tabla IV.4, reflejan la ausencia de la capacidad de degradar la caseína aportada al medio por parte de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* analizadas. Si tenemos presente la bibliografía de los diferentes aislamientos de esta subespecie llevados a cabo en los últimos años, podremos comprobar que la mayor parte de las cepas no presentan esta actividad proteolítica (Grimes *et al.*, 1984a, Grimes *et al.*, 1984b; Fouz *et al.*, 1992; Fouz *et al.*, 1993; Labella *et al.*, 2010a). En contraposición, recientemente Khouadja *et al.* (2014) publicaron que 9 de los 13 aislados de doradas y lubinas cultivadas, exhibían actividad caseinasa.

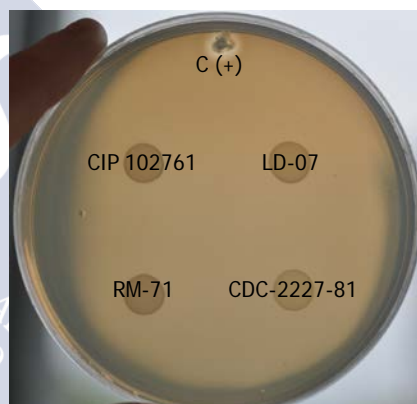


Fig. IV.52: Evaluación de la actividad caseinasa de aislados de *P. damsela* subsp. *damsela*. Visualizaremos un halo transparente cuando la actividad sea positiva. Control (+): *Aeromonas hydrophila* CMA 153.

Dado que ninguna de las cepas gelatinasa positivas analizadas de *P. damsela* subsp. *damsela* hidroliza la caseína, consideramos que ColP, al igual que el resto de colagenasas de la clase II, no presenta tal actividad (Tabla IV.8). Teramura *et al.* (2011) consideran que una explicación plausible para la diferencia de especificidad de sustrato entre ambas clases, podría ser la divergencia entre sus dominios proteicos. De ese modo, conjeturaron que la razón por la que la colagenasa de *G. hollisae* de clase III no hidroliza caseína, es la ausencia del dominio proteico PKD. Debido a esta discrepancia con respecto al resto de enzimas de la clase III, Teramura *et al.* (2011)

consideraron a la collagenasa de *G. hollisae* como una excepción de las proteasas de esta clase, llegando incluso a sugerir la formación de un nuevo grupo de collagenasas de *Vibrio* spp. La collagenasa de *P. damsela* subsp. *damsela* ColP, del mismo modo que el resto de sus homólogos de la clase II, no porta el dominio PKD (Tabla IV.8).

En definitiva, si bien la secuencia del dominio conservado HEXXH-E presupone la agrupación de ColP como una peptidasa M9A de clase III, la organización de los dominios proteicos y la incapacidad para hidrolizar caseína, nos sugiere que ColP podría considerarse como de clase II, o bien podría constituir una nueva clase de collagenasas de *Vibrio* spp.

4.5.6. ColP es una collagenasa termolábil secretada al medio extracelular

Si bien en la literatura se usan indistintamente los términos gelatinasa y collagenasa para referirse a enzimas que hidrolizan gelatina, ambas enzimas poseen sustratos de actuación diferentes. Las gelatinasas son enzimas capaces de degradar la gelatina, es decir, colágeno desnaturalizado soluble en agua. Por su parte, las collagenasas verdaderas son un tipo de proteasas que no solo digieren gelatina, sino que son capaces de descomponer la rígida organización del colágeno (fibrillas polipeptídicas enrolladas helicoidalmente), atacando específicamente los enlaces X-Gly de su triple hélice (Watanabe, 2004; Duarte *et al.*, 2014; Pal & Suresh, 2016). Con respecto a *P. damsela* subsp. *damsela*, los estudios previos solo han centrado su interés en la hidrólisis de gelatina, relegando el conocimiento de su posible carácter collagenolítico.

Dado que ColP es una metaloproteasa de la familia M9, y que solo éstas son consideradas como collagenasas verdaderas, decidimos estudiar su capacidad para hidrolizar colágeno. Para ello analizamos la capacidad de los productos extracelulares de la cepa gelatinolítica AVL49 de degradar el péptido sintético FALGPA (2-furanacryloyl-Leu-Gly-Pro-Ala). FALGPA es considerado como un péptido sintético idóneo y específico para el estudio de las collagenasas bacterianas (Lim *et al.*, 1995). Para ello, primero se obtuvieron los productos extracelulares mediante la técnica del celofán (Liu, 1957) y

posteriormente se cuantificó su actividad enzimática sobre el péptido FALGPA (Sigma), siguiendo el protocolo indicado en Material y Métodos (sección 3.12.3.2.2).

Los resultados obtenidos revelaron que los productos extracelulares de la cepa AVL49 consiguieron hidrolizar el péptido sintético, mientras que el mutante para *colP* (AVL60) rindió un valor de 0 unidades en el test de hidrólisis de FALGA (Tabla IV.9). Estos datos nos señalan que ColP de *P. damsela* subsp. *damsela* es capaz de hidrolizar colágeno nativo, al igual que las colagenasas de *Vibrio* spp. homólogas (Tabla IV.8). Dada la gran variedad de colágenos existentes (28 tipos), la especificidad de las colagenasas bacterianas a éstos varía. Si bien en el presente trabajo no se ha llegado a indagar en este hecho, en otras investigaciones llevadas a cabo con las colagenasas de *Vibrio* spp., se ha estudiado la capacidad de hidrolizar los colágenos más abundantes en animales, tales como los de tipo I, II o III (Tabla IV.8). Por otra parte, dado que el tratamiento de calentamiento a 60 °C durante 10 min abolió la capacidad de los productos extracelulares de hidrolizar FALGPA, podemos afirmar que la colagenasa ColP de AVL49 es termolábil, al igual que VchC de *V. cholerae*, VMC de *V. mimicus*, y PrtV y VppC de *V. parahaemolyticus* (Tabla IV.8).

Tabla IV.9: Resultados de la hidrólisis del péptido FALGPA para la determinación de la actividad colagenolítica de productos extracelulares (ECPs) de la cepa AVL49 de *P. damsela* subsp. *damsela* y su mutante para *colP*. Los valores corresponden a valores medios realizados en tres ensayos independientes; errores estándar ≤ 20%.

Muestra de ECPs	A _{345nm}	Unidades/mL
AVL49 (LD-07Rf ^R)	0,074	28
AVL60 ($\Delta colP$)	-0,284	0
AVL49 (calentamiento a 60 °C)	-0,016	0

En otro orden de ideas, aproximadamente el 50% de las proteínas sintetizadas en el citoplasma bacteriano se insertan en una membrana (por ejemplo, la membrana plasmática), o son liberadas al medio extracelular (Papanikou *et al.*, 2007). Generalmente, las proteínas de

inserción en membrana son transportadores, canales relacionados con la conversión de energía o transductores sensoriales y, por su parte, las proteínas secretadas pueden ser enzimas hidrolíticas o toxinas, entre otras (Chatzi *et al.*, 2013). Si bien es cierto que nuestros intentos por detectar la actividad gelatinasa en placas de agar con gelatina, en los productos extracelulares de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* positivas para tal actividad han sido fallidos, la detección de la actividad colagenolítica de FALGPA en los ECPs de la cepa gelatinasa positiva AVL49 pero no en los del mutante para *colP* (Tabla IV.9), y el hecho de que a lo largo de la bibliografía existente diversos estudios sí hayan sido capaz de detectarla (Labella *et al.*, 2010a), nos permite afirmar que la colagenasa ColP de *P. damsela* subsp. *damsela* es una enzima secretada al medio extracelular.

Si bien es cierto que las colagenasas homólogas a ColP del género *Vibrio* son también extracelulares, los mecanismos de secreción son desconocidos para la gran mayoría de ellas (Tabla IV.8). A fin de iniciar un estudio preliminar que nos aportase información acerca del modo de secreción de ColP, decidimos clonar esta enzima en la cepa S17-1- λ pir de *Escherichia coli*, microorganismo sin actividad gelatinasa. Si esta especie bacteriana fuese capaz de degradar la gelatina, nos indicaría que la secreción de ColP podría realizarse mediante un sistema de secreción general y conservado entre especies, como podría ser el SSTII, vía de secreción de la colagenasa homóloga VchC de *V. cholerae* (Park *et al.*, 2015). Como se puede apreciar en la Fig. IV.53, la introducción del gen *colP* clonado en el plásmido pAVL484 en *E. coli* S17-1- λ pir le confiere la capacidad de hidrolizar la gelatina aportada al medio de cultivo tras tres días de incubación a 25 °C. Si bien es cierto que los halos de degradación producidos por la cepa de *E. coli* con el plásmido pAVL484 son mucho más reducidos que los de la cepa salvaje LD-07, este resultado sugiere que, al menos, parte de la colagenasa ColP es secretada al exterior a través de un sistema de transporte conservado.

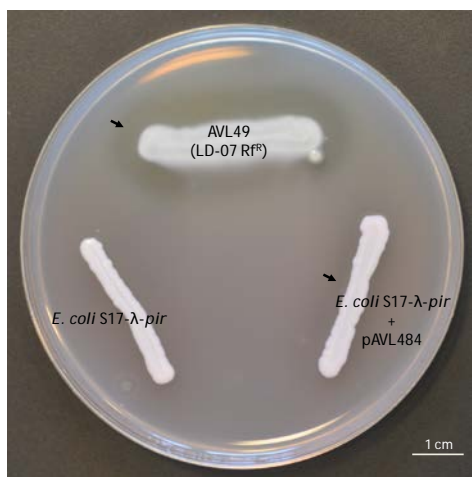


Fig. IV.53: Actividades gelatinasa de las cepas AVL49 y *E. coli* S17-1- λ pir portadora del gen *colP* (pAVL484: pBBR1-MCS5-*colP*). Como control negativo se utilizó la cepa S17-1- λ pir de *E. coli*. Las flechas negras indican el halo de degradación de gelatina. La barra de escala representa 1 cm.

Continuando en esta línea de ideas, varias metaloproteasas dependientes de zinc, incluyendo las colagenasas microbianas, han demostrado ser proteínas extracelulares que precisan de una secuencia señal para ayudar al transporte a través de las membranas celulares bacterianas (David *et al.*, 1992; Milton *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1995). Como ya se ha comentado en la sección 4.5.4 de este capítulo, ColP presenta un posible péptido señal en el extremo N-terminal, que comprende las posiciones entre el aminoácido 1 y el 21 (Fig. IV.50). La presencia de este péptido señal parece indicar que ColP podría ser secretada a través de un sistema de secreción dependiente de Sec como puede ser el Sistema de Secreción General, también denominado SSTII (Sistema de Secreción de tipo II) (Thanassi *et al.*, 2005). En el capítulo 4.8 de Resultados y Discusión afrontaremos la cuestión del mecanismo de secreción de ColP al medio extracelular.

4.5.7. ColP contribuye a la virulencia en cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1

Durante las últimas décadas, se han reunido evidencias que sustentan la hipótesis de que el crecimiento y la proliferación de bacterias patógenas dependen de la acción conjunta de las enzimas

proteolíticas (Travis *et al.*, 1995, Roberts *et al.*, 2013). Actualmente, el papel de las colagenasas microbianas en la fisiología de sus productores y en la patogénesis está poco estudiado. De manera general, se considera que la síntesis bacteriana de enzimas colagenolíticas extracelulares puede cumplir varias funciones: i) liberar aminoácidos del colágeno necesarios para el crecimiento bacteriano, ii) facilitar la propagación de bacterias y toxinas por la destrucción de tejido; y iii) proporcionar un ambiente adecuado para el crecimiento y la multiplicación bacteriana (Harrington, 1996; Prabakaran, 2015). Incluso, se ha llegado a sugerir que las colagenasas bacterianas pueden ayudar al patógeno a superar las defensas del hospedador (Soares *et al.*, 2008). Tal y como hemos apuntado en la introducción, actualmente, el estudio de las colagenasas durante el proceso infectivo ha sido relegado principalmente a especies de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. A pesar de ello, desde el punto de vista de Zhang *et al.* (2015), las colagenasas de *Clostridium* y *Vibrio* podrían desempeñar roles similares.

Con el propósito de estudiar la contribución de la colagenasa ColP a la capacidad patogénica de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* carente de pPHDD1, se infectaron un total de 10 lubinas con el mutante para el gen *colP* (AVL60), y los resultados obtenidos se compararon con los porcentajes de supervivientes infectados con la cepa parental (AVL49) y la cepa triple mutante (AVL68). Al igual que en el resto de los ensayos de virulencia, los peces fueron aclimatados a 24 °C antes de realizar el desafío por inyección intraperitoneal de suspensiones bacterianas en solución salina (NaCl al 0,85%), empleando una dosis de $2,5 \times 10^6$ UFC/pez. Además, la mortalidad de los peces se registró diariamente durante 8 días post-inoculación, sembrando en TSA-1 y TCBS los riñones de peces muertos y confirmando las colonias obtenidas mediante la amplificación del gen *ureC* (Osorio *et al.*, 2000b).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

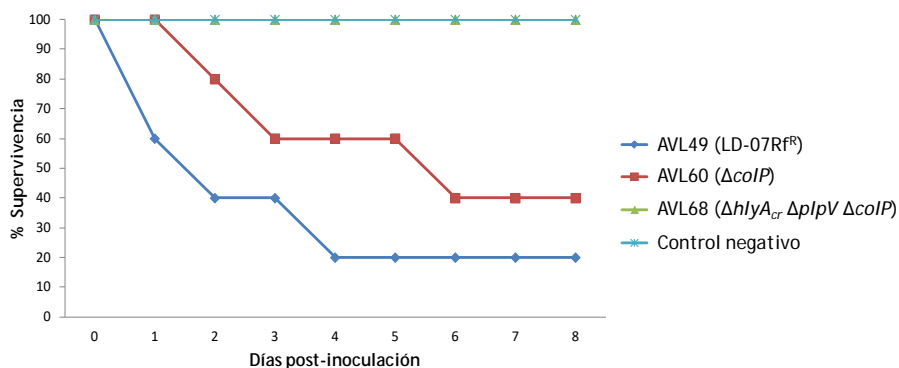


Fig. IV.54: Supervivencia (%) de lubinas tras inoculación intraperitoneal con la dosis de $2,5 \times 10^6$ UFC/pez de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* (\nexists pPHDD1) AVL49, el mutante simple AVL60 ($\Delta colP$) y el triple mutante AVL68 ($\Delta hlyA_{cr} \Delta plpV \Delta colP$). Empleamos como control peces inyectados con solución salina (n=10 peces por cepa).

Tras ocho días avanzados después del desafío con las diferentes cepas, pudimos observar que la cepa salvaje AVL49 mataba al 80% de las lubinas infectadas (Fig. IV.54). Por su parte, los valores de supervivencia registrados en el caso del mutante simple AVL60 ($\Delta colP$), mostraron un ligero aumento de los mismos, alcanzando el 40% de peces supervivientes. Si bien encontramos que la mutación simple de *colP* en la cepa AVL49 redujo la virulencia con respecto a la cepa parental, esta reducción fue menor que la observada anteriormente con los mutantes para los genes *hlyA_{cr}* y *plpV* (Fig. IV.42). Por otro lado, tal y como se esperaba, el triple mutante *hlyA_{cr} plpV colP* (AVL68) no resultó ser virulento en las condiciones y dosis ensayadas (Fig. IV.54). Estos resultados muestran que cuando se infecta por vía intraperitoneal, *colP* tiene un efecto bajo sobre la virulencia en lubina. Sin embargo, no puede excluirse que la ruta de infección que hemos utilizado en este estudio pueda eludir los mecanismos de defensa del hospedador y las barreras naturales. Por lo tanto, no se puede descartar un posible papel de *ColP* en la colonización durante el proceso infectivo en peces, donde la actividad de la collagenasa podría proporcionar una ventaja selectiva durante la infección en condiciones naturales. Así por ejemplo, la collagenasa VppC de *V. parahaemolyticus* genera una degradación directa de los

tejidos de pez cebra, promoviendo el proceso de invasión (Luan *et al.*, 2007). Con respecto a la colagenasa VAC de *V. alginolyticus*, Yishan *et al.* (2011) relacionaron la presencia del gen *vac* con cepas virulentas. Incluso, aunque su papel en la patogénesis no ha sido estudiado en detalle, se ha propuesto que las colagenasas de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, dos especies que causan infecciones en heridas, contribuyen a la diseminación de las bacterias por digestión de los componentes de la matriz extracelular (Shinoda & Miyoshi, 2011). En contraposición, la colagenasa VchC no contribuyó a la capacidad de *V. cholerae* para colonizar los intestinos de ratón y pez cebra, ni a la transmisión de las bacterias de peces infectados a peces no infectados, aunque se considera que este hecho podría deberse a una redundancia funcional, ya que este microorganismo produce una(s) proteasa(s) colagenolítica(s)/gelatinolítica(s) adicional (Park *et al.*, 2015). A la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que la colagenasa ColP de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* no portadora del plásmido pPHDD1, contribuye a la virulencia en lubina.



4.6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN *P. DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE*

Las enzimas lipolíticas son un grupo de enzimas sintetizadas por una amplia gama de seres vivos tales como animales, plantas y microorganismos. Independientemente de su naturaleza, todas ellas poseen una característica en común: catalizan la hidrólisis de los enlaces éster formados entre un ácido y un alcohol (Ro *et al.*, 2004). A ese respecto, las enzimas lipolíticas como lipasas y esterases de bacterias patógenas han sido relacionadas especialmente con la patogenicidad en humanos (Stehr *et al.*, 2003).

Si bien en la familia *Vibrionaceae* se han identificado enzimas lipolíticas en especies como *Vibrio cholerae* (Ogierman *et al.*, 1997; Hausmann & Jaeger, 2010), *V. parahaemolyticus* (Hausmann & Jaeger, 2010), *V. vulnificus* (Su *et al.*, 2004), *V. harveyi* (Teo *et al.*, 2003), *V. fischeri* (Ranjitha *et al.*, 2009), *Photobacterium lipolyticum* (Ryu *et al.*, 2006) o *Photobacterium* spp. (Kim *et al.*, 2012), su contribución al proceso infectivo ha sido escasamente investigado. Con respecto a *P. damsela* subsp. *damsela*, varios han sido los trabajos que han informado acerca de la existencia de cepas con capacidad para degradar lípidos (Fouz *et al.*, 1992; Pedersen *et al.*, 1997; Labella *et al.*, 2006; Labella *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2011; Khouadja *et al.*, 2014), pero hasta el momento, no se ha indagado en la búsqueda de las bases genéticas de esta actividad, ni de su posible implicación en la patogenicidad en peces.

4.6.1. *P. damsela* subsp. *damsela* presentan variabilidad en cuanto a su actividad lipolítica en tween 80 y tween 20

Los denominados “tweens” (ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán), son los sustratos más ampliamente utilizados en la detección de bacterias lipolíticas en medios de agar (Plou *et al.*, 1998). La serie tween está compuesta por tween 20, 40, 60 y 80. Estos ésteres difieren en la longitud de las cadenas de ácidos grasos. Entre la serie de los tween, el tween 80 es el más empleado para detectar la actividad lipasa/esterasa en medios de agar (Plou *et al.*, 1998). Es por eso que en la mayoría de los estudios realizados en *P. damsela* subsp. *damsela*, la actividad lipolítica de los aislados fue evaluada mediante

la capacidad de hidrolizar el tween 80. El tween 80 o polisorbato 80, es un compuesto derivado de la etoxilación del sorbitano y su posterior monoesterificación con ácido oleico (ácido graso de cadena larga monoinsaturado de 18 átomos de carbono). En base a este dato, iniciamos el estudio de la actividad lipolítica en medio tween 80 en los 49 aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* disponibles en el cepario del laboratorio (Tabla III.1 de Material y Métodos). La detección de dicha actividad se llevó a cabo a través del crecimiento en placas de TSA-1 suplementadas con tween 80 (Sigma) al 1%, tras su incubación a 25 °C durante 72 horas (sección 3.12.2.1 de Material y Métodos). Aquellas cepas con capacidad de hidrolizar tween 80, mostrarán un precipitado granulado a su alrededor debido a la precipitación del ácido oleico liberado por la escisión de tween 80 (Fig. IV.55A). Tal y como podemos observar en la Tabla IV.4, aproximadamente el 82% de los aislados analizados presentan la capacidad de hidrolizar el tween 80. Si bien es cierto que la mayoría de nuestras cepas estudiadas exhiben esta actividad lipolítica al igual que en otros estudios (Fouz *et al.*, 1992; Pedersen *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 2011 y Khouadja *et al.*, 2014), los trabajos de Grimes *et al.* (1984a; 1984b) y Labella *et al.* (2010a) no identificaron ninguna cepa con dicha actividad enzimática.

Además, teniendo presentes las características de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* disponibles, no se pudo establecer una correlación entre la degradación de tween 80 y la fuente de aislamiento o el origen geográfico (Tabla IV.4). Asimismo, se han localizado aislados positivos para este carácter tanto en cepas con pPHDD1 como en cepas sin plásmido, dato que nos sugiere que el responsable genético de esta actividad podría localizarse en uno de los cromosomas de esta bacteria marina (Tabla IV.4). Destacamos por lo tanto, que las cepas *P. damsela* subsp. *damsela* tienen carácter variable en cuanto a la actividad lipolítica en tween 80, y que éste es independiente de la presencia o ausencia del plásmido pPHDD1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

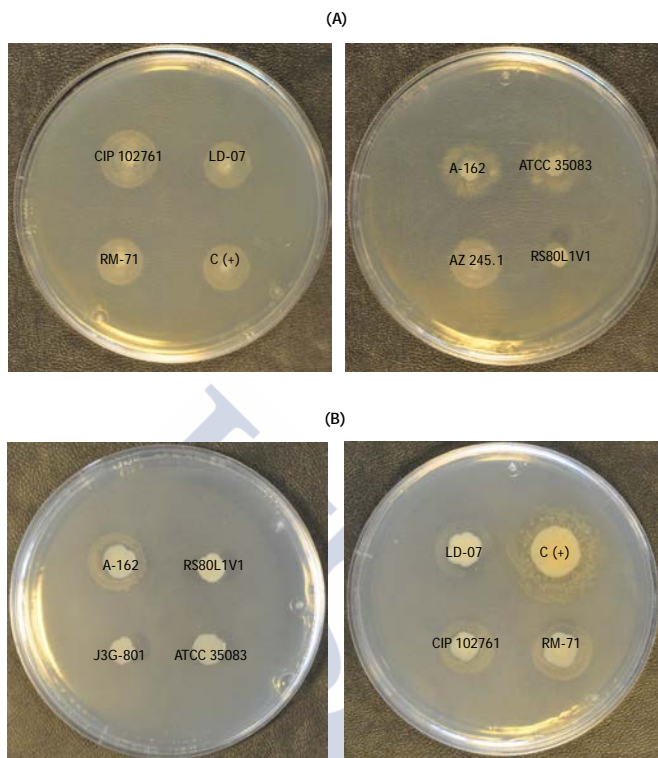


Fig. IV.55: Algunos ejemplos de la detección de la actividad lipolítica de *P. damsela* subsp. *damsela* en medio tween 80 (A) y tween 20 (B), tras incubación a 25 °C durante 72 días y 48 horas, respectivamente. Control positivo: *Aeromonas hydrophila* CMA 153.

Por otra parte, Labella *et al.* (2010a) también estudiaron la actividad lipolítica de sus aislados en medio suplementado con tween 20. El medio tween 20 o polisorbato 20, es un compuesto derivado de la etoxilación del sorbitano y su posterior monoesterificación con ácido láurico (ácido graso saturado de cadena larga de 12 átomos de carbono). Según sus resultados, el 70% de sus aislados mostraban la capacidad de hidrolizar tween 20. Con la finalidad de conocer esta actividad en nuestras cepas, se llevó a cabo su detección a través de crecimiento en placas de TSA-1 suplementadas con tween 20 (Sigma) al 1%, tras 72 horas de incubación a 25 °C. Al igual que en el caso anterior, la cepas positivas para este carácter mostrarán un granulado a

su alrededor pero esta vez debido a la precipitación de ácido láurico (Fig. IV.55B). Nuestros resultados muestran que el 100% de los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* analizados en el presente estudio tienen la capacidad de hidrolizar tween 20 (Tabla IV.4), porcentaje elevado al igual que en el estudio de Labella *et al.* (2010a). Si bien es cierto que todas las cepas testadas exhibieron actividad enzimática sobre tween 20, no todas lo hicieron en el mismo tiempo de incubación. La mayoría de las cepas ya mostraron el halo de precipitado a las 24 horas, mientras que solo tres lo exhibieron a las 48 horas (datos no mostrados). Una posible explicación de estas diferencias podría ser la cantidad de inóculo empleado en cada cepa sobre el medio de agar, o incluso deberse a diferencias de crecimiento o actividad lipolítica entre cepas. Del mismo modo que en el caso anterior, no pudimos hallar una correlación entre hospedador, origen geográfico, presencia/ausencia de pPHDD1 y actividad lipolítica en tween 20.

Al comparar las actividades lipolíticas visualizadas en tween 80 y tween 20, percibimos que aquellas cepas que no hidrolizan tween 80 sí hidrolizan tween 20 (Tabla IV.4). Esto nos sugiere la presencia de al menos dos enzimas lipolíticas diferentes responsables de los fenotipos observados. Además, éstas podrían estar codificadas por uno de los cromosomas de *P. damsela* subsp. *damsela* y no por el plásmido pPHDD1.

4.6.2. El gen *lip80* es el responsable de la hidrólisis de tween 80 en *P. damsela* subsp. *damsela*

Con la finalidad de localizar el gen responsable de la actividad lipolítica observada en medio tween 80 y exhibida por la mayoría de las cepas testadas, decidimos analizar esta capacidad enzimática en una colección de mutantes por transposición en la cepa AVL49 (LD-07Rf^R) de *P. damsela* subsp. *damsela*. Para ello, se llevó a cabo una mutagénesis aleatoria con el transposón mini-Tn10 (Herrero *et al.*, 1990) (sección 3.8.3 de Material y Métodos), obteniendo una librería de mutantes en LD-07 y se buscaron genes candidatos en aquellos mutantes que no presentaron actividad lipolítica en tween 80.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez se obtuvo la librería de mutantes por transposición con mini-Tn10 en la cepa AVL49, aproximadamente 2.500 clones se crecieron en placas TSA-1 suplementadas al 1% con tween 80. Aquellos mutantes Tn10 que mostraron cambio en el halo de precipitación en placa, fueron candidatos a contener inserciones en genes relacionados con la actividad lipolítica. Tras la incubación a 25°C durante 3 días, localizamos dos mutantes, Δ AVL49::Tn10(1) y Δ AVL49::Tn10(2), con ausencia de precipitado (Fig. IV.56A), así como un tercer mutante Δ AVL49::Tn10(3) que atrajo nuestra atención debido a la aparición tardía del precipitado lipolítico (Fig. IV.57).

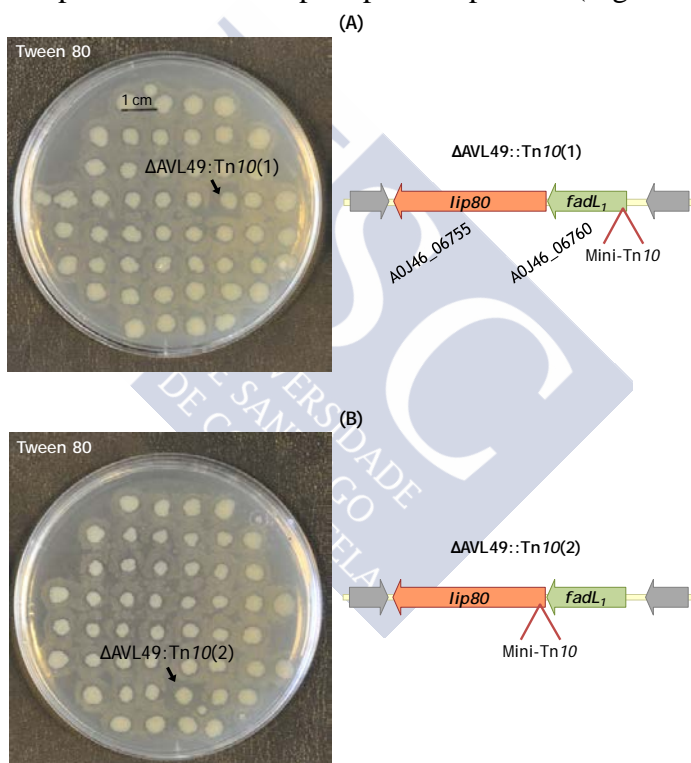


Fig. IV.56: A la izquierda, test de las actividades lipolíticas en tween 80 de mutantes Tn10 de la cepa LD-07 de *P. damselae* subsp. *damselae*, tras 3 días de incubación a 25 °C. Las flechas señalan los clones Δ AVL49::Tn10(1) (A) y Δ AVL49::Tn10(2) (B) con ausencia de actividad lipolítica en tween 80. Escala de referencia, 1 cm. A la derecha, representación del posible operón constituido por los genes del transportador de ácidos grasos de cadena larga FadL y la posible enzima lipolítica Lip80 en el genoma de la cepa LD-07. Se indica en cada caso la inserción del transposón mini-Tn10.

El siguiente paso a seguir fue el de averiguar qué genes estaban inactivados en los mutantes $\Delta\text{AVL49}::\text{TnI0}(1)$, $\Delta\text{AVL49}::\text{TnI0}(2)$ y $\Delta\text{AVL49}::\text{TnI0}(3)$ por la inserción del transposón mini-TnI0. Para ello, mediante clonación (sección 3.8.3.2 de Material y Métodos) se identificaron las secuencias flanqueantes al transposón mini-TnI0 en los dos mutantes, y se determinó su localización en el genoma de la cepa LD-07. Comenzando con el mutante $\Delta\text{AVL49}::\text{TnI0}(1)$, curiosamente, el transposón se insertó en la ORF A0J46_06760 del cromosoma I, cuya secuencia aminoacídica presentó una identidad del 56% con la proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga FadL de *Vibrio cholerae* (Fig. IV.56A). El hecho de que este tipo de mutante no muestre actividad lipolítica, a pesar de que en el genoma de LD-07 se hayan encontrado dos genes homólogos a FadL (más abajo, Fig. IV.63A), nos sugiere una transcripción conjunta entre *fadL* y el gen adyacente anotado como posible lipasa (A0J46_06755), de modo que la inserción del transposón en *fadL* podría estar causando efectos polares y comprometer la transcripción del gen de la posible lipasa. Por otro lado, este tipo de transportadores parece estar relacionado con la captación de los ácidos grasos de cadena larga hidrolizados en el medio extracelular por la lipasa/esterasa bacteriana (Pride *et al.*, 2013). Con respecto al mutante $\Delta\text{AVL49}::\text{TnI0}(2)$, el transposón se insertó en el cromosoma I al comienzo de un gen cuyo producto está anotado como lipasa (A0J46_06755), a la que denominaremos de ahora en adelante Lip80 (enzima lipolítica en tween 80) (Fig. IV.56B). Curiosamente, los genes del transportador FadL y de Lip80 forman parte del mismo operón de genes cuya co-transcripción ha sido demostrada en *V. cholerae* (Pride *et al.*, 2013). Asimismo, señalamos que el resto de los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* analizados, cepas todas ellas lipolíticas en medio tween 80, contienen este mismo operón lipolítico.

En lo relativo al mutante $\Delta\text{AVL49}::\text{TnI0}(3)$ con capacidad lipolítica en tween 80 tardía, el transposón mini-TnI0 truncó un gen anotado como regulador transcripcional de la familia TetR (A0J46_11500) (Fig. IV.57). Este regulador transcripcional está presente en los cuatro genomas estudiados, sean o no cepas lipolíticas en tween 80 (cepa CIP 102761: VDA_003363; cepa RM-71:

A0J47_1053; y cepa A-162: A9D46_05170). La familia de reguladores TetR forma parte de los denominados sistemas de transducción de señal de un solo componente (Cuthbertson & Nodwell, 2013). Muchos miembros de esta familia son elementos represores, sin embargo, hay excepciones importantes que actúan como activadores o que asumen roles no relacionados con la transcripción. Si bien los miembros de esta familia son conocidos por su papel como reguladores de las bombas de flujo de antibióticos, se sabe que los miembros caracterizados regulan numerosos aspectos de la fisiología bacteriana, llegando a interactuar con una amplia gama de ligandos tales como ácidos grasos (Cuthbertson & Nodwell, 2013). Ejemplos de reguladores transcripcionales de la familia TetR relacionados con el anabolismo de ácidos grasos son FabR de *E. coli* (Feng & Cronan, 2011) o Fad35R de *Mycobacterium tuberculosis* (Anand *et al.*, 2012). Del mismo modo, también se han descrito miembros relacionados con el catabolismo de ácidos grasos como FadR de *Bacillus subtilis* (Tojo *et al.*, 2011), *Pseudonocardia autotrophica* (Chen *et al.*, 2005) y *Thermus thermophilus* (Agari *et al.*, 2011). Debemos destacar que *P. damsela* subsp. *damsela* presenta en su genoma los reguladores transcripcionales FabR (A0J46_13425) y FadR (A0J46_06580) relacionados con el anabolismo y catabolismo, respectivamente, de ácidos grasos, por lo que podríamos descartar, a priori, la participación de este regulador TetR en estos procesos metabólicos.

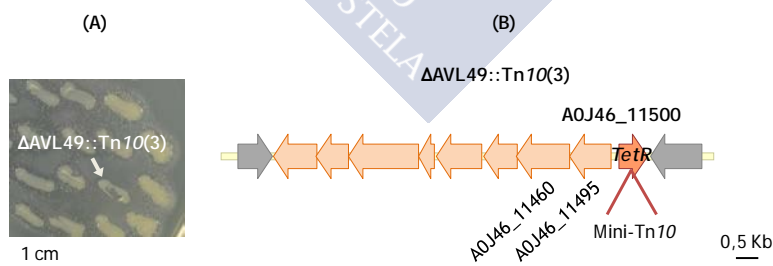


Fig. IV.57: (A) Fenotipo lipolítico en tween 80 del mutante con actividad tardía Δ AVL49::Tn10(3). (B) Representación esquemática del regulador transcripcional de la familia TetR truncado por el transposón mini-Tn10 en el mutante Δ AVL49::Tn10(3). TetR está orientado de manera divergente en relación a los genes que regula, presentando una zona intergénica con respecto a A0J46_11495 de 178 pares de bases.

Los reguladores TetR se pueden clasificar en tres tipos en función de la orientación y la proximidad de su gen estructural en relación con los genes adyacentes en el cromosoma (Ahn *et al.*, 2012). Estas relaciones se pueden emplear para predecir los genes diana regulados por TetR. La mayoría de estos reguladores se clasifican como tipo I, dado que sus genes muestran una orientación divergente a uno de los genes adyacentes (Ahn *et al.*, 2012), como es el caso de A0J46_11500 (Fig. IV.57B). Esta relación es predictiva de una conexión reguladora en aquellos casos en que la región intergénica entre los dos genes sea inferior a 200 pb, como es en nuestro caso (178 pb), aunque una región más larga no descarta una posible relación reguladora (Ahn *et al.*, 2012; Cuthbertson & Nodwell, 2013). Teniendo presente esta información, hipotetizamos que A0J46_11500 es un regulador que podría estar actuando sobre el operón de genes adyacentes (A0J46_11495-A0J46_11460) relacionados con la biosíntesis de lipopolisacáridos de membrana y de la cápsula bacterianas. Consideramos por lo tanto, que la actividad lipolítica tardía característica del mutante Δ AVL49::TnI0(3) podría ser debida a causa de una deficiencia de crecimiento bacteriano al verse alterada la biosíntesis de la membrana y/o de la cápsula por la mutación en su regulador transcripcional.

En base a los resultados obtenidos con la mutagénesis por transposición de la cepa lipolítica en tween 80 de *P. damsela* subsp. *damsela* AVL49, decidimos considerar a Lip80 como la enzima candidata a ser la responsable de este fenotipo enzimático.

4.6.2.1. Todas las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* con actividad lipolítica en tween 80 poseen el gen *lip80* codificado en el cromosoma I

El primer paso para iniciar un estudio pormenorizado de *lip80*, fue el de establecer si existía una correlación entre la capacidad de hidrolizar tween 80 presentada por la mayoría de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, y la presencia del gen *lip80* en sus genomas. Para ello, amplificamos por PCR la región interna del gen *lip80* empleando los cebadores diseñados sobre el genoma de la cepa LD-07: *lipasa_int_F* y *lipasa_int_R* (Fig. IV.58A; Tabla III.4 de

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material y Métodos). Mediante este reacción en cadena de la polimerasa, pudimos confirmar que todas las cepas que degradaban tween 80 poseen el gen *lip80* (Fig. IV.58B; Tabla IV.4). Por el contrario, las cepas sin dicha capacidad enzimática son negativas para la amplificación de dicho gen.

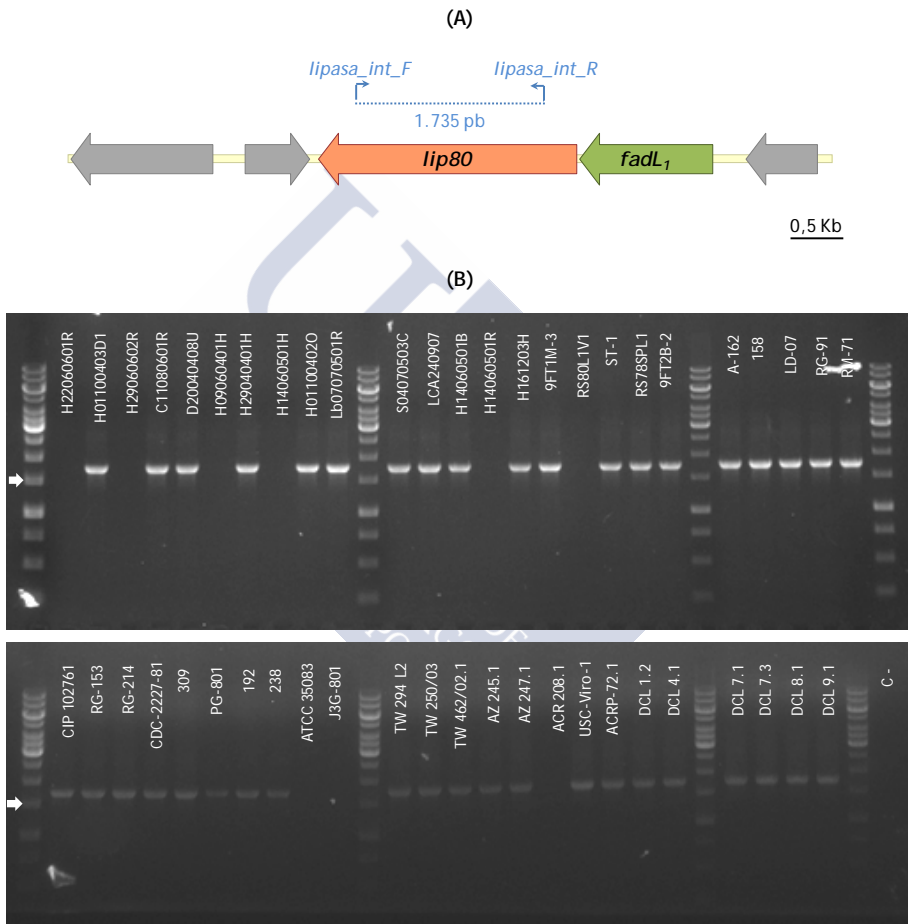


Fig. IV.58: (A) Representación esquemática del contexto genético de *lip80* en el genoma de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*. Se muestran los cebadores y el tamaño esperado del producto de PCR. (B) Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR obtenidos tras amplificar 49 cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* con los cebadores de *lipasa_int_F* y *lipasa_int_R*. La flecha blanca nos subraya la banda de 1,5 Kb del marcador de peso molecular.

Una vez establecida la correlación entre actividad lipolítica en tween 80 y presencia del gen *lip80*, la siguiente cuestión que abordamos fue la de conocer si el contexto genético de dicho gen estaba conservado en todas las cepas tween 80 positivas. Primeramente, comparamos los contextos genéticos de *lip80* en los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* disponibles. Tal y como podemos contemplar en la Fig. IV.59A (números 6 y 7), el operón lipolítico constituido por *fadL* y *lip80*, está flanqueado por los genes codificadores de la subunidad C de la alquil hidroperoxidasa reductasa y de la ribonucleasa T. Posteriormente, con el fin de confirmar la misma ubicación de *lip80* en el resto de las cepas con actividad lipolítica, amplificamos mediante PCR la región adyacente a *lip80-fadL* mediante el uso de los cebadores *mut_lipasa_I_XhoI* y *mut_lipasa_4_SmaI* (Fig. IV.59B; Tabla III.4 de Material y Métodos). El resultado de dicha PCR reveló que las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* con capacidad lipolítica en medio tween 80, presentan en la misma posición de sus cromosomas I, el operón lipolítico constituido por el transportador de ácidos grasos de cadena larga FadL y la lipasa/esterasa Lip80 (Fig. IV.59C). Dado que los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* disponibles corresponden a cepas lipolíticas en tween 80, decidimos tomar los productos de PCR de dos cepas negativas y secuenciarlos. El resultado mostró la ausencia del operón *fadL-lip80* en cepas negativas para el fenotipo tween 80, así como la conservación de los genes adyacentes, codificadores de la subunidad C de la alquil hidroperoxidasa reductasa y de la ribonucleasa T (Fig. IV.59B).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

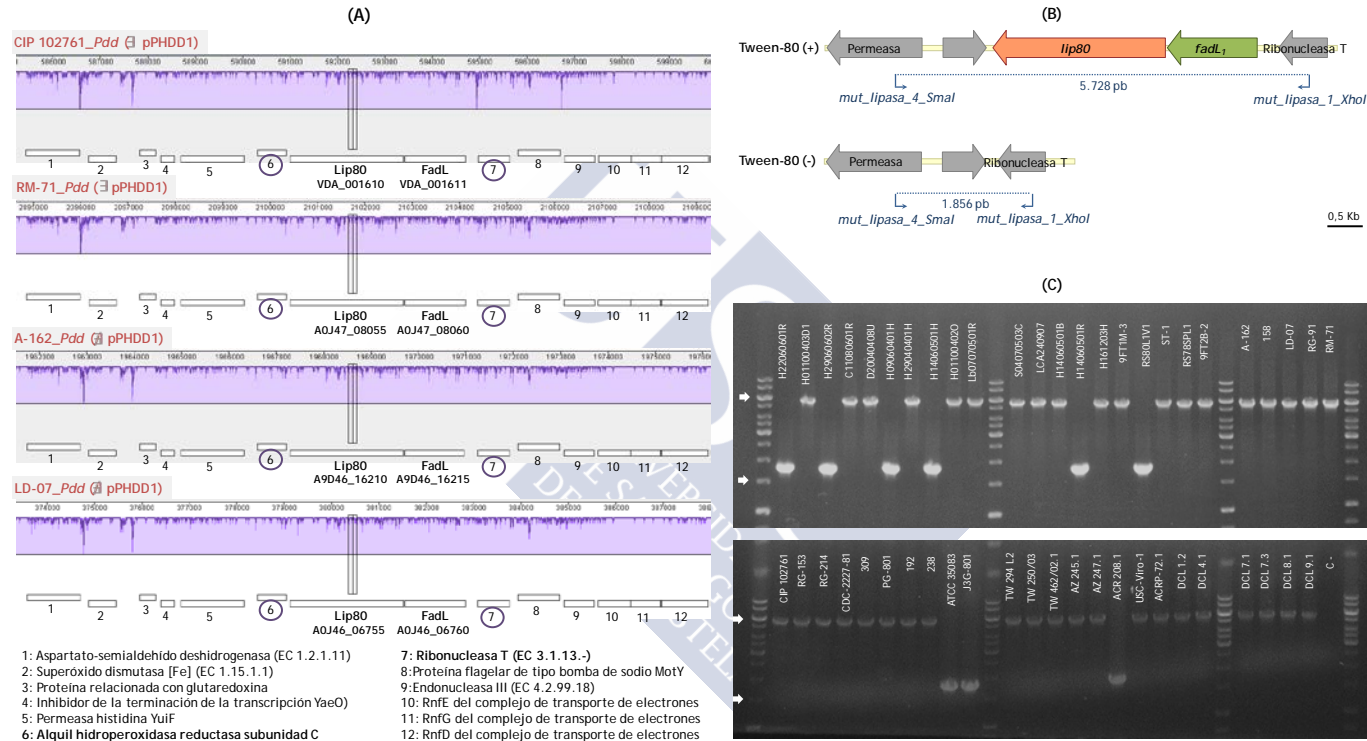


Fig. IV.59: (A) Comparación nucleotídica del contexto genético de *lip80* en los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* indicados, realizada mediante el programa MAUVE. (B) Contextos genéticos de las cepas positivas y negativas para la hidrólisis de tween 80. Se indican los cebadores y tamaños esperados de los productos de PCR. (C) Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR obtenidos tras amplificar 49 cepas con los cebadores *mut_lipasa_1_XhoI* y *mut_lipasa_4_SmaI*. Las flechas blancas nos indican las bandas de 6 y 1,5 Kb del marcador de peso molecular.

4.6.2.2. Lip80 muestra homología con lipasas de la familia *Vibrionaceae*, entre otras

La búsqueda de enzimas homólogas a Lip80 (A0J46_06755) mediante el servidor BLASTP, evidenció su similitud con toda una serie de enzimas lipolíticas tales como las lipasas de *Photobacterium angustum* (66% identidad, 99% cobertura), *P. leiognathi* (66%, 100%), *P. piscicola* (57%, 99%), *P. toruni* (57%, 99%), *P. phosphoreum* (55%, 99%), *P. iliopiscarium* (57%, 99%), *P. aquimaris* (56%, 100%), *P. profundum* (51%, 100%), *P. proteolyticum* (51%, 98%), *P. halotolerans* (54%, 100%), *P. aquae* (52%, 100%), *P. kishitanii* (52%, 97%) y *P. carnosum* (50%, 97%). Asimismo, Lip80 muestra alta identidad con lipasas de otros miembros de la familia *Vibrionaceae*: *Enterovibrio nigricans* (54%, 99%), *E. norvegicus* (48%, 99%), *E. coralii* (48%, 99%), *E. pacificus* (36%, 97%), *Thaumasiovibrio occultus* (44%, 99%), *Grimontia indica* (36%, 99%), *Thaumasiovibrio subtropicus* (35%, 99%), *Vibrio casei* (34%, 97%), *V. alginolyticus* (34%, 99%), *V. parahaemolyticus* (35%, 99%), *V. aestuarianus* (34%, 99%), *V. vulnificus* (34%, 99%), *V. crassostreae* (35%, 99%) y VolA de *V. cholerae* (33%, 99%), entre otras.

Se realizó además un análisis filogenético empleando los homólogos anteriores, incorporando las lipasas Lip y Pla-1 de *Aeromonas hydrophila* (Chuang *et al.*, 1997; Merino *et al.*, 1999). Así, como podemos observar en el dendrograma de la Fig. IV.60, las enzimas de la familia *Vibrionaceae* se clasifican perfectamente en un conjunto independiente al establecido para las del género *Aeromonas* (valores de bootstrap de 100 para cada uno de ellos). En un primer examen, podemos vislumbrar dos grupos independientes con valores de bootstrap de 100 que albergan principalmente lipasas de especies de los géneros *Photobacterium* y *Vibrio*. En lo relativo a Lip80 de *P. damsela* subsp. *damsela*, observamos que dicha enzima agrupa perfectamente con el resto de las enzimas de *Photobacterium* spp., estando más próxima desde el punto de vista filogenético a las lipasas de *P. angustum* y *P. leiognathi*.

Ante las evidencias obtenidas hasta el momento, consideramos a la enzima Lip80 como la candidata a ser la responsable de la actividad

lipolítica detectada (en tween 80) en la mayoría de los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela*.

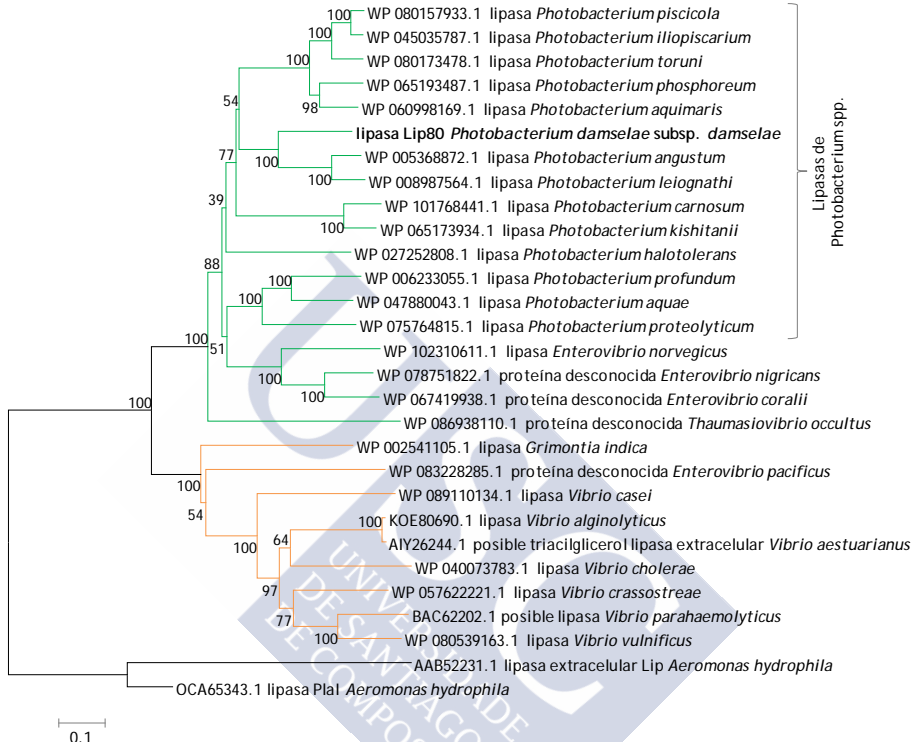


Fig. IV.60: Comparación de secuencias de aminoácidos que representa la relación filogenética de Lip80 de *P. damsela* subsp. *damsela* con enzimas relacionadas. El árbol filogenético se construyó empleando el método Neighbor-joining (1000 bootstraps) empleando el programa MEGA 6. En la figura se muestran los números de acceso en GenBank. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

4.6.2.3. Lip80 es la responsable de la actividad lipolítica detectada en tween 80

Con la finalidad de demostrar nuestra hipótesis de que el gen *lip80* es el responsable de la actividad lipolítica detectada en tween 80 en el 82% de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, construimos en primer lugar, un mutante por intercambio alélico del gen *lip80* (AVL70) en la cepa AVL49 (Δ pPHDD1). Los cebadores diseñados

sobre el genoma de la cepa LD-07 destinados a la construcción del mutante AVL70 (LD-07Rf^R $\Delta lip80$) se muestran en la Tabla III.6 (ver Material y Métodos). Una vez obtenido dicho mutante, analizamos su actividad lipolítica en placas de TSA-1 suplementadas con tween 80 al 1%. Tras 3 días de incubación a 25 °C, se procedió al visualizado de dicha actividad enzimática.

Como se puede apreciar en la Fig. IV.61, la delección de *lip80* en la cepa AVL49 conllevó la pérdida de la capacidad de hidrolizar tween 80. Para poder asegurar que el fenotipo observado en el mutante AVL70 se debía únicamente a la delección del gen *lip80* y no a efectos polares u otras causas, se procedió a complementar la cepa mutante con el alelo salvaje. Para ello, se amplificó mediante PCR el operón *fadL-lip80* junto con su promotor (ver cebadores en Tabla III.7 de Material y Métodos) y se clonó en el vector pBBR1-MCS5 (Kovach *et al.*, 1995) obteniendo el plásmido pAVL473. Al complementar el mutante AVL70 (LD-07Rf^R $\Delta lip80$) con el plásmido pAVL473, se restauró el fenotipo lipolítico mostrado por la cepa parental (Fig. IV.61). Curiosamente, si bien es cierto que *lip80* es el responsable de la hidrólisis de tween 80, no lo es en el caso de la degradación de tween 20 ya que su delección no abolió dicha actividad (Fig. IV.61), lo que sugiere la presencia de otra enzima lipolítica, tal y como ya habíamos predicho.

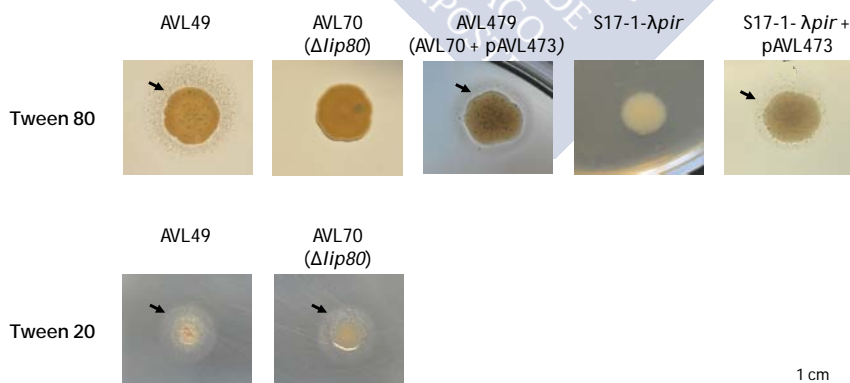


Fig. IV.61: Fenotipos lipolíticos en tween 80 y tween 20 de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* indicadas. Las flechas negras señalan el halo de degradación de los medios tween. La barra de escala representa 1 cm.

En conjunto, estos resultados indican sin lugar a dudas, que la actividad lipolítica de los aislados de *P. damsela* subsp. *damsela* detectada en placas de TSA-1 suplementadas con 1% de tween 80, depende de la acción de la enzima Lip80. Además, podemos afirmar que la actividad lipolítica observada en tween 20 depende de la acción de otra enzima diferente a Lip80.

4.6.2.4. Análisis *in silico* de la lipasa/esterasa Lip80: ¿una nueva familia de α/β -hidrolasas?

El gen *lip80* consta de un total de 2.394 pb, cuya proteína Lip80 predicha posee 798 aminoácidos con una masa teórica de 84,65 kDa y pI de 4,58 (Stothard, 2000). La predicción de la estructura secundaria de Lip80 (35% de cobertura y 100% de confianza) realizada con el servidor Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) que emplea como modelo la hidrolasa Cthe_0052 de *Ruminiclostridium thermocellum* (PDB 4S1A) (Filippova *et al.*, 2015), reveló que esta enzima exhibe la estructura típica de la clase α/β -hidrolasas (estructura central formada por 7 láminas β interconectadas por hélices α) (Ollis *et al.* 1992) (Fig. IV.62). El centro activo de este tipo de enzimas tiene tres aminoácidos catalíticos cuyas posiciones dentro del plegamiento suelen ser conservadas. Los tres aminoácidos que forman la triada catalítica son la serina nucleofílica (S), un ácido aspártico (D) o un ácido glutámico, y una histidina (H). La serina catalítica está generalmente incluida en el pentapéptido conservado G-X-S-X-G (donde X puede ser cualquier aminoácido) (Arpigny & Jaeger, 1999). Lip80, como miembro de esta clase de hidrolasas, presenta el motivo conservado con la serina catalítica en el centro del motivo conservado G-X-S-X-G (Fig. IV.62; Fig. IV.63B). Debemos destacar que la representación estructural de Lip80 no retrata toda la molécula, ya que tan solo se representa el 35% de su secuencia. Este hecho sugiere el escaso conocimiento de este tipo de enzimas lipolíticas.



Fig. IV.62: Estructura secundaria predicha para Lip80, empleando como molde *Ruminiclostridium thermocellum* (PDB 4S1A) mediante el servidor Phyre2 y editado con Chimera. En naranja se señalan las hélice- α y en violeta las lámina- β . La serina nucleotílica del dominio conservado G-X-S-X-G está resaltada en amarillo.

El análisis *in silico* de los dominios proteicos de Lip80 mediante Pfam, reveló la presencia de un dominio que ocupa las posiciones 1 a 266, caracterizado por primera vez en la lipasa Lip de *Aeromonas hydrophila* (Chuang *et al.*, 1997) denominado “*Lipase_bact_N_lipase*” (Pfam: PF12262). Se considera que este dominio se localiza en el extremo N-terminal, presentando además, regiones potenciales para la señalización celular (Finn *et al.*, 2016). Por otro lado, la base de datos Pfam establece como enzima de arquitectura de dominios semejante a Lip80 a la lisofosfolipasa A VolA de *V. cholerae* (Pride *et al.*, 2013). Este hallazgo tampoco nos resulta extraño dado que VolA es una de las enzimas homólogas presentada por BLAST (Fig. IV.60). Según las investigaciones de Pride *et al.* (2013), la lipasa VolA forma parte de un operón que se co-transcribe conjuntamente junto con el transportador de ácidos grasos de cadena larga FadL. Además, este operón lipolítico no solo es exclusivo de *V. cholerae*, si no que está presente en especies lipolíticas tales como *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* o *V. vulnificus* (Fig. IV.63A). Curiosamente, las lipasas de estos operones de *Vibrio* spp. se corresponden con las

enzimas homólogas de la sección 4.6.2.2 (Fig. IV.60). Del mismo modo, Lip80 de *P. damsela* subsp. *damsela*, parece formar parte junto con el transportador FadL de la misma unidad genética funcional (Fig. IV.63A). Además, *P. damsela* subsp. *damsela*, al igual que las especies de *Vibrio* spp. analizadas, posee otros dos genes homólogos al transportador FadL en su genoma (Fig. IV.63A). Según la hipótesis establecida para la lipasa VolA de *V. cholerae*, el transportador de membrana externa FadL sería el encargado de interiorizar hasta el periplasma los ácidos grasos liberados tras la acción de la enzima, los cuales, tras un proceso desconocido, llegarían al citoplasma celular donde serían convertidos en acil-CoA por FadD, ligasa de ácidos grasos de cadena larga y CoA (homólogo en *P. damsela* subsp. *damsela*: A0J46_01675). Finalmente, los ácidos grasos activados pueden utilizarse para la biosíntesis de fosfolípidos o como fuente de carbono para la célula (Pride *et al.*, 2013).



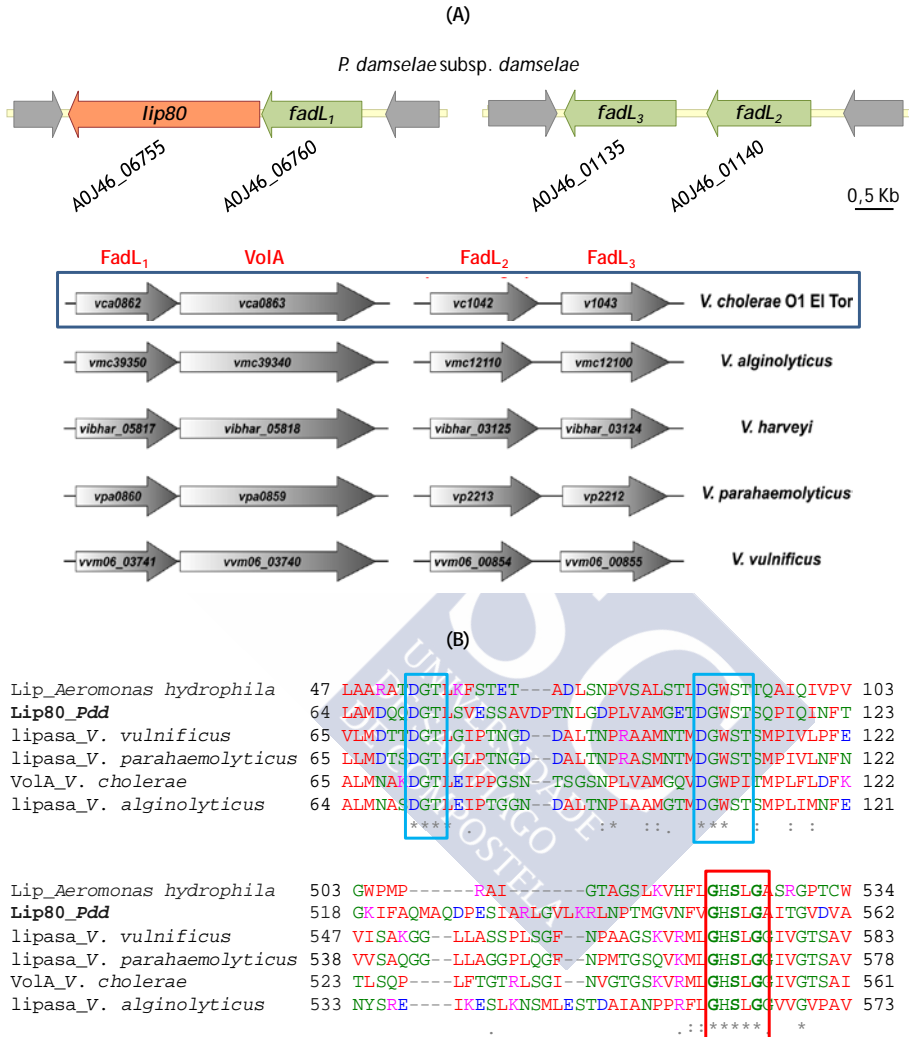


Fig. IV.63: (A) Organización genómica de los transportadores FadL y Lip80 en la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*, y sus homólogos en otras especies del género *Vibrio* (Imagen tomada de Pride *et al.*, 2013). (B) Secciones de los alineamientos proteicos de Lip80 de *P. damsela* subsp. *damsela* con Lip de *Aeromonas hydrophila*, VolA de *V. cholerae*, y las lipasas de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*. En recuadro azul se indican los dos motivos conservados de la familia “*Lipase_bact_N_lipase*”. En recuadro rojo se señala el motivo G-X-S-X-G típico de la mayoría de las α/β -hidrolasas. El alineamiento aminoacídico se ha llevado a cabo mediante Clustal Omega.

Tomando las secuencias proteicas de Lip80, de sus homólogos en *Vibrio* spp. y de Lip de *Aeromonas hydrophila* (enzima de referencia del dominio “*Lipase_bact_N_lipase*”), llevamos a cabo un alineamiento de las mismas mediante el servidor Clustal Omega. Tal y como ya hemos mencionado, al igual que la mayoría de las enzimas lipolíticas α/β -hidrolasas, Lip80 presenta la serina catalítica conservada dentro del motivo típico G-X-S-X-G (Ollis *et al.*, 1992) (Fig. IV.63B). Asimismo, como miembro de la familia “*Lipase_bact_N_lipase*”, Lip80 muestra los dos motivos conservados en la misma: DGT y DGWST (Chuang *et al.*, 1997), al igual que el resto de sus homólogos (Fig. IV.63B).

Por último, las enzimas lipolíticas se clasifican en base a las secuencias aminoacídicas y a sus propiedades biológicas. La clasificación más aceptada es la realizada por Arpigny & Jaeger (1999), que incluye un total de ocho familias. Entre ellas nos topamos con la familia II, también conocida como familia GDSL, en la que habíamos incluido a la fosfolipasa PlpV caracterizada en el capítulo 4.4 de Resultados y Discusión. Según estos autores, solo los miembros de la familia I podrían considerarse como lipasas verdaderas, es decir, enzimas capaces de hidrolizar triglicéridos. Valiéndonos de las enzimas lipolíticas clasificadas en la revisión llevada a cabo por Ramnath *et al.* (2017) como referencia, así como las lipasas homólogas de *Vibrio* spp. y Lip80 como muestras, llevamos a cabo un análisis filogenético con la esperanza de poder catalogarlas en alguna de las familias establecidas. El árbol filogenético obtenido presenta ramas principales poco robustas con valores de bootstrap bajos, lo que refleja la gran diversidad de enzimas lipolíticas. Como se puede apreciar en la Fig. IV.64, la enzima Lip80 y sus homólogas del género *Vibrio* no se agruparon en ninguna de las familias lipolíticas establecidas.

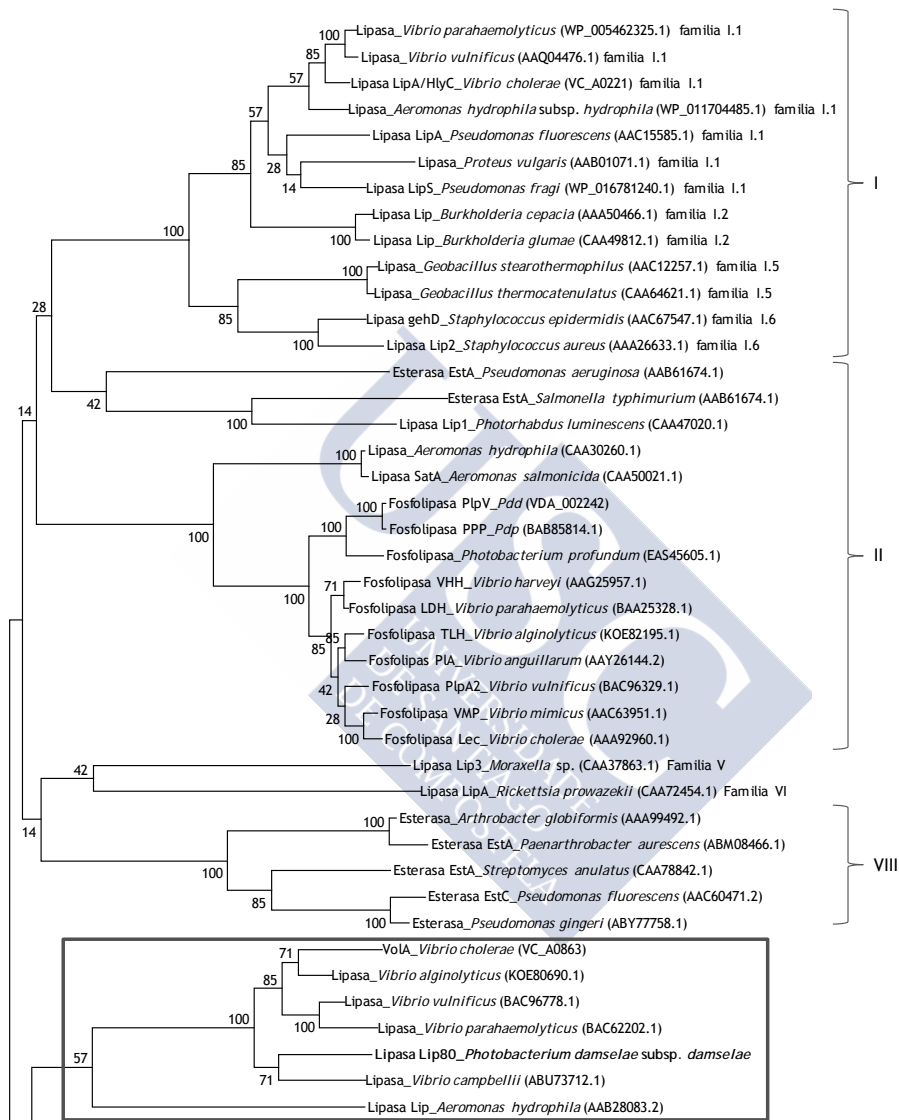


Fig. IV.64: Árbol filogenético desenraizado de enzimas lipolíticas clasificadas según los criterios establecidos por Arpigny & Jaeger (1999). Análisis *in silico* construido empleando el método Neighbor-joining (1000 bootstraps) por el programa MEGA 6. En la figura se muestran los números de acceso en GenBank de las proteínas. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

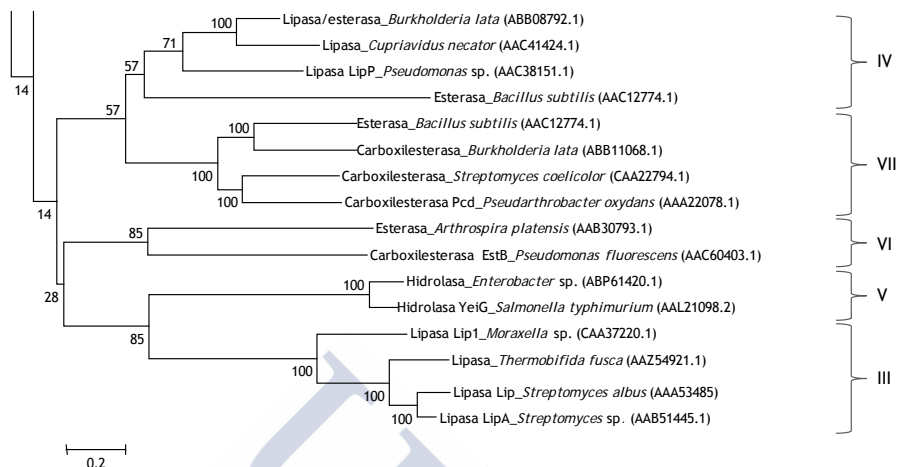


Fig. IV.64 (Cont.): Árbol filogenético desenraizado de enzimas lipolíticas clasificadas según los criterios establecidos por Arpigny & Jaeger (1999). Análisis *in silico* construido empleando el método Neighbor-joining (1000 bootstraps) por el programa MEGA 6. En la figura se muestran los números de acceso en GenBank de las proteínas. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio. (*Pdd*) *P. damsela* subsp. *damsela*; (*Pdp*) *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Es más, la clasificación original de 8 familias ha ido aumentando con el paso del tiempo. Por un lado, la familia I se ha llegado a subdividir en un total de 7 subfamilias (Jaeger & Eggert, 2002), y hasta un total de 16 familias se han ido creando. La familia IX sería introducida por Handrick *et al.* (2001), la familia X por Levisson *et al.* (2007) y Bassegoda *et al.* (2012), la familia XI por Lee *et al.* (2006), la familia XII por Kim *et al.* (2009b), la familia XIII por Ewis *et al.* (2004) y Liu *et al.* (2004). La familia XIV sería creada por Rao *et al.* (2011), la familia XV por Bayer *et al.* (2010) y Lee *et al.* (2010), y por último la familia XVI por Fu *et al.* (2013). Teniendo en cuenta estos avances, volvimos a realizar un árbol filogenético entre Lip80 y sus homólogas pero esta vez con los miembros de estas nuevas familias. Tal y como podemos observar en la Fig. IV.65, Lip80, al igual que sus homólogas, no se agrupa con ninguna de las familias recientes. Al igual que nuestro resultado, la base de datos de α/β -hidrolasas ESTHER, tampoco es capaz de incorporar a la familia

“*Lipase_bact_N_lipase*” en la clasificación de Arpigny y Jaeger (Lenfant *et al.*, 2013).

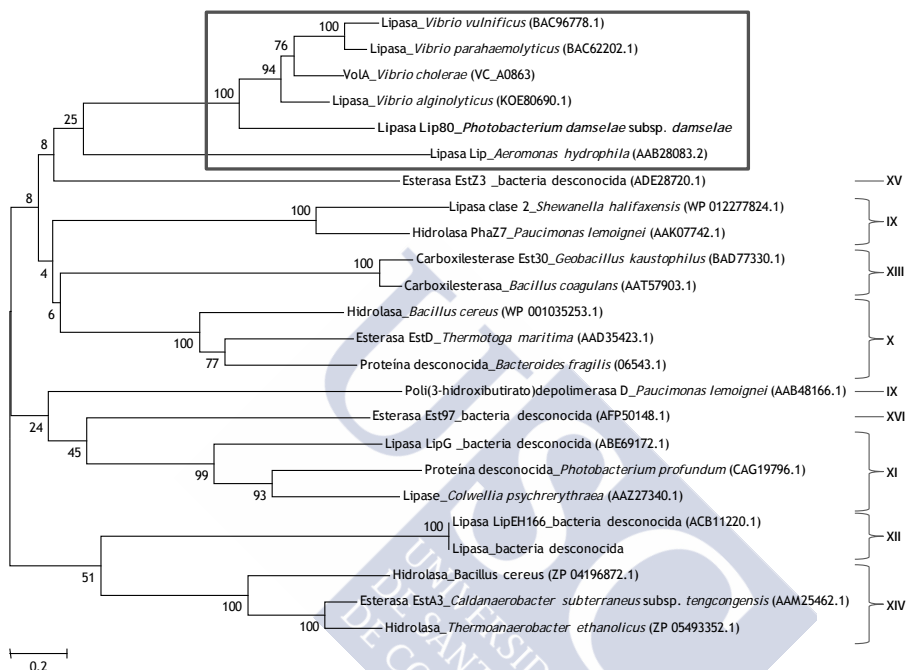


Fig. IV.65: Árbol filogenético desenraizado de enzimas lipolíticas pertenecientes a las nuevas familias de α/β -hidrolasas. Análisis *in silico* construido empleando el método Neighbor-joining (1000 bootstraps) por el programa MEGA 6. En la figura se muestran los números de acceso en GenBank de las proteínas. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

En base a estos datos, podemos decir que tal vez estemos ante la presencia de una nueva familia de enzimas lipolíticas, hecho no tan extraño teniendo en cuenta que varios autores ya han sugerido la presencia de nuevas familias de enzimas lipolíticas (Lee *et al.*, 2006; Kang *et al.* 2011). Las enzimas hidrolíticas están muy extendidas en organismos eucariotas y procariotas, y cumplen una enorme variedad de funciones. No es de extrañar que la conservación de los residuos catalíticos se pueda encontrar a lo largo de las familias de enzimas lipolíticas entre diferentes especies evolutivas, probablemente porque los procesos celulares dentro de diferentes organismos pueden

parecerse unos a otros. A fecha de hoy, no hay un ejemplo en el que una familia de enzimas se pueda asignar solo a una especie (Bender & Flieger, 2010). Sin embargo, hay indicios de una correlación entre las bacterias patógenas y el número de enzimas hidrolíticas en relación con la virulencia bacteriana (Banerji y Flieger, 2004).

4.6.2.5. Lip80, posible lipoproteína anclada en la membrana externa

Rosenau y Jaeger (2000) recopilaron los tres modos de secreción de enzimas lipolíticas en Gram negativos. Así por ejemplo, las lipasas de *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia marcescens* se secretan a través del SSTI (dependiente de los transportadores ABC), mientras que las lipasas de *Pseudomonas aeruginosa* o *Bacillus glumae* lo hacen empleando el SSTII (dependiente de Sec/Tat). Incluso se ha demostrado que la esterasa EstA de *Pseudomonas aeruginosa* se secreta a través de su propio dominio C-terminal autotransportador. Si bien solo hemos incluido un número bajo de ejemplos de enzimas lipolíticas secretadas, varios son los trabajos que se han centrado en este tema, especialmente en las enzimas de bacterias patógenas para humanos. Dado que la actividad lipolítica de *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido detectada en los productos extracelulares por varios estudios (Fouz *et al.*, 1993; Labella *et al.*, 2010a), y la predicción de un péptido señal mediante SignalP nos muestra una secuencia con las características de enzimas secretadas dependientes del sistema Sec, decidimos considerar en un principio a Lip80 como una enzima extracelular.

Curiosamente, al estudiar la bibliografía acerca de las lipasas Lip y Pla-1 de *Aeromonas hydrophila* y VolA de *V. cholerae*, nos llamó poderosamente la atención su identificación como lipoproteínas de membrana externa, no solo desde un punto de vista teórico si no también experimental (Pride *et al.* 2013, Chuang *et al.*, 1997). Las lipoproteínas bacterianas ancladas a la membrana celular juegan un papel fundamental tanto en la fisiología bacteriana (división celular, conjugación, adquisición de nutrientes, transducción de señales, etc) como en la virulencia (adhesión, colonización, invasión, evasión al sistema inmune del hospedador) (Zückert, 2014). Si bien es cierto que son escasos los ejemplos de lipoproteínas que se secretan a través de

la membrana externa y que permanezcan ancladas en la superficie bacteriana, podemos citar algunas de ellas en bacterias patógenas: la fosfolipasa VolA de *V. cholerae* (Pride *et al.*, 2013), la lipoproteína Lpp de *E. coli* (Konovalova & Silhavy, 2015), la pululanasa PulA de *Klebsiella oxytoca*, las proteínas transportadoras de hierro LbpB y TbpB de *Neisseria gonorrhoeae*, la proteasa NalP de *Neisseria meningitidis* o la lipoproteína OspA de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, entre otras (Zückert, 2014).

Una de las características de las lipoproteínas de bacterias Gram negativas es que la escisión de su péptido señal es llevada a cabo en el periplasma por una peptidasa señal de tipo II (Zückert, 2014). El servidor informático LipoP 1.0 (Juncker *et al.*, 2003) es capaz de predecir el péptido señal para esta peptidasa II. Al igual que sucede con las lipasas VolA de *V. cholerae* (Pride *et al.*, 2013) y Lip de *Aeromonas hydrophila* (Chuang *et al.*, 1997), Lip80 presenta un péptido señal de lipoproteína de 18 aminoácidos, por lo que podríamos considerarla como una lipoproteína con actividad lipolítica (Fig. IV.66).

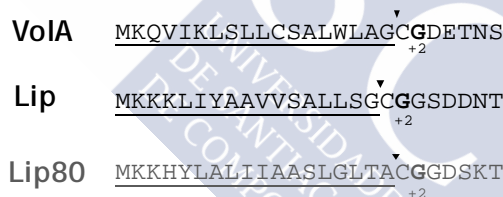


Fig. IV.66: Péptido señal característico de las lipoproteínas predicho para las lipasas VolA de *V. cholerae*, Lip de *A. hydrophila* y Lip80 de *P. damsela* subsp. *damsela* mediante Lipo 1.0. En subrayado se indica el péptido señal. El triángulo señala el punto de corte de la peptidasa de tipo II. En negrita se indica la posición +2 posterior al punto de corte.

Por otro lado, las lipoproteínas en Gram negativas están localizadas en la membrana interna o membrana externa dependiendo del tipo de señal que porten. Más concretamente, algunas lipoproteínas se anclan a la capa interna de fosfolípidos de la membrana externa, dejando la mitad de su estructura hacia el periplasma (Narita & Tokudo, 2017), mientras que otras, en cambio, abarcan toda la membrana externa exponiendo la mitad de su estructura al medio extracelular, como es el caso de Lpp de *E. coli*

(Konovalova & Silhavy, 2015). En casos como los de VolA y Pula, se anclan a la capa externa de fosfolípidos de la membrana externa (Zückert, 2014; Pride *et al.*, 2013). En este orden de ideas, la presencia del aminoácido aspartato (D) en la posición +2 después del punto de corte de la peptidasa señal II es clave para el anclaje de las lipoproteínas en la membrana interna. Por el contrario, la presencia de un aminoácido distinto a D lo es para su anclaje en la membrana externa (Yamaguchi *et al.* 1988; Yakushi *et al.*, 1997; Okuda & Tokuda, 2011). Al igual que VolA y Lip, la enzima Lip80 presenta un residuo diferente al aspartato en la posición +2 después del sitio de escisión del péptido señal (Fig. IV.66) y, basándose en las reglas que rigen la clasificación y localización de las lipoproteínas, la lipoproteína debería estar localizada en la membrana externa.

Apoyando la hipótesis de que Lip80 es una lipoproteína con actividad lipolítica anclada a la membrana, la detección de dicha actividad de los productos extracelulares de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* en placas de TSA-1 suplementadas con Tween-80 al 1%, resultó infructuosa. Por otro lado, el hecho de que Lip80, al igual que VolA (Pride *et al.*, 2014), pueda expresarse adecuadamente en la cepa S17-1- λ pir de *E. coli* portadora de *lip80* (pAVL473) (Fig. IV.61), combinado con los recientes descubrimientos de que Lpp de *E. coli* y VolA de *V. cholerae* están expuestas a la superficie (Cowles *et al.*, 2011; Pride *et al.*, 2013), indica que tanto *E. coli* como *V. cholerae* y *P. damsela* subsp. *damsela*, expresan la maquinaria requerida para transportar lipoproteínas a la superficie externa, y por lo tanto, podrían exportar Lip80.

4.6.2.6. La mutación del gen codificante de Lip80 no causa una detectable disminución de la virulencia para lubina de cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pHDD1

Tal y como ya se ha comentado en la introducción, las enzimas lipolíticas son consideradas como factores de virulencia en un amplio rango de bacterias patógenas, ya que favorecen la diseminación y adhesión bacterianas en los tejidos del hospedador, así como el escape

del sistema inmune, entre otros roles (Fig. I.15, de Introducción). Si bien es cierto que no hemos hallado trabajos que relacionen la patogenicidad con enzimas lipolíticas semejantes a Lip80, numerosas lipasas verdaderas (familia I) han sido relacionadas con la patogenicidad. De ese modo, relacionan la capacidad de la lipasa LipA/HlyC de *V. cholerae* de descomponer la capa de moco que protege el epitelio intestinal, con una mejora en la capacidad de colonización de ratones (Fiore *et al.*, 1997). Con el propósito de conocer la posible contribución de la enzima lipolítica Lip80 en la capacidad patogénica de la cepa AVL49 carente de pPHDD1, se infectaron un total de 10 lubinas con el mutante para *lip80* (AVL70), y se compararon estos resultados con los porcentajes de supervivientes infectados con la cepa parental (AVL49). Al igual que en el resto de los ensayos de virulencia, los peces fueron aclimatados a 24 °C antes de realizar el desafío por vía intraperitoneal de suspensiones bacterianas en solución salina (NaCl al 0,85%), empleando una dosis de $2,5 \times 10^6$ UFC/pez. Además, la mortalidad de los peces se registró diariamente durante 8 días post-inoculación, sembrando en TSA-1 y TCBS los riñones de peces muertos y confirmando las colonias obtenidas mediante la amplificación del gen *ureC* (Osorio *et al.*, 2000b).

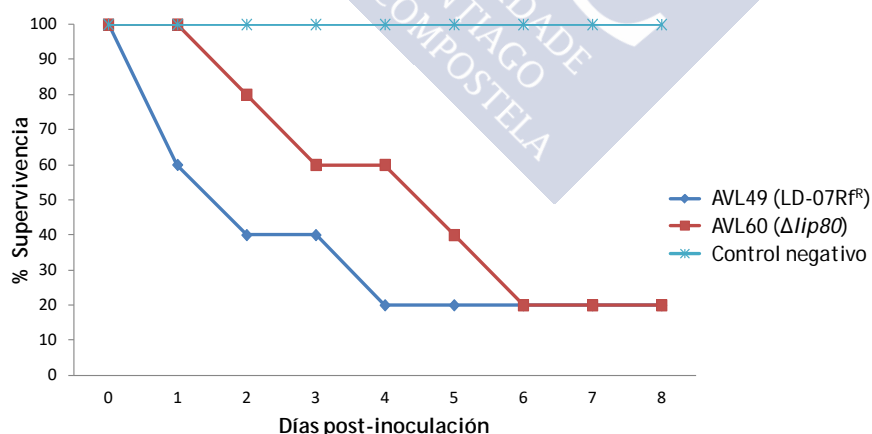


Fig. IV.67: Supervivencia (%) de lubinas tras inoculación intraperitoneal con la dosis de $2,5 \times 10^6$ UFC/pez de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* (Δ pPHDD1) AVL49 y el mutante simple AVL70 ($\Delta lip80$). Empleamos como control peces inyectados con solución salina (n=10 peces por cepa).

Tras ocho días avanzados después del desafío con las diferentes cepas, pudimos observar que tanto la cepa salvaje AVL49 como el mutante simple AVL70 ($\Delta lip80$), causaron la muerte del 80% de las lubinas infectadas (Fig. IV.67). A la vista de estos datos, podemos afirmar que la mutación de *lip80* no causa una detectable disminución de la virulencia para lubina, en la cepa AVL49 de *P. damsela* subsp. *damsela* no portadora del plásmido pPHDD1. Si bien el presente trabajo se ha enfocado únicamente en el estudio del rol de Lip80 en la virulencia tras inoculación intraperitoneal, sería interesante analizar su participación en otro tipo de procesos, dado que, por ejemplo, se ha llegado a sugerir que la lipasa homóloga VolA de *V. cholerae* podría favorecer la adaptación y supervivencia del organismo en ambientes diferentes (Pride *et al.*, 2014).

4.6.3. Búsqueda del gen responsable de la capacidad de hidrolizar tween 20

Dado que las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*, sean portadoras o no de *lip80*, y los mutantes por delección AVL70 y por transposición AVL49::*Tn10*(1) y AVL49::*Tn10*(3) muestran todos ellos actividad lipolítica en tween 20 (Fig. IV.68A), decidimos volver a obtener mutantes por transposición con mini-*Tn10*, con el objetivo esta vez, de localizar el gen responsable de tal actividad enzimática. En esta ocasión, realizamos la transposición no solo en la cepa salvaje AVL49 sino también en el mutante lipolítico AVL70 ($\Delta lip80$).

Una vez se obtuvo la librería de mutantes por transposición en las cepas AVL49 y AVL70, analizamos aproximadamente 2.500 clones de cada librería en placas de TSA-1 suplementadas al 1% con tween 20 (Sigma). Aquellos mutantes *Tn10* que mostraron cambios en el halo de precipitación en placa fueron candidatos a contener inserciones en genes relacionados con la actividad lipolítica en tween 20. Tras incubación a 25°C durante 72 horas, no hallamos ningún mutante sin actividad lipolítica en tween 20. En contraposición, encontramos dos mutantes con fenotipos lipolíticos interesantes: $\Delta AVL49::Tn10(4)$ y $\Delta AVL70::Tn10(1)$. El mutante por transposición de la cepa parental $\Delta AVL49::Tn10(4)$ atrajo nuestro interés debido a su dificultad de crecimiento en TSA-1 y bajo halo de precipitado

lipolítico (Fig. IV.68B). Teniendo presente la Fig. IV.68A, la cepa parental AVL49 genera un halo de degradación de 2,7 cm de diámetro, mientras que el de Δ AVL49::Tn10(4) es de 1,5 cm. Con respecto al mutante Δ AVL70::Tn10(1), nos interesó la aparición tardía del precipitado lipolítico a pesar de presentar un crecimiento aparentemente normal (Fig. IV.68A).

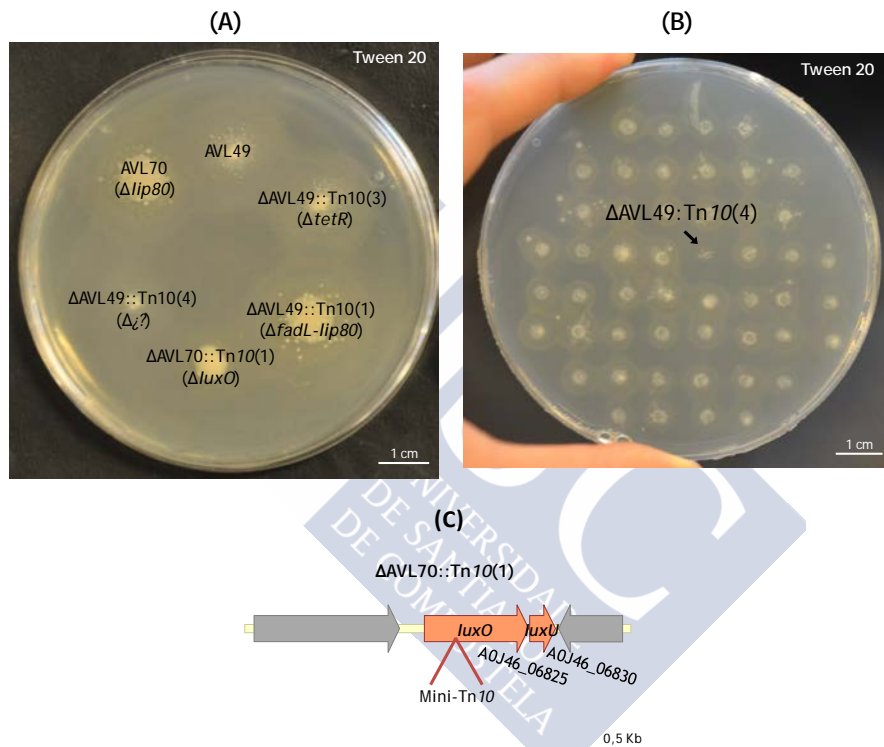


Fig. IV.68: (A) Actividades lipolíticas en tween 20 de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* indicadas, tras 3 días de incubación a 25 °C. (B) Mutante Δ AVL49::Tn10(4) de *P. damsela* subsp. *damsela* con deficiencia en actividad lipolítica en tween 20 obtenido tras la transposición con mini-Tn10 de la cepa AVL49. (C) Representación esquemática del gen para el regulador LuxO truncado por el transposón mini-Tn10 en el mutante Δ AVL70::Tn10(1).

El siguiente paso a seguir fue el de averiguar qué genes estaban inactivados por la inserción del transposón mini-Tn10 en los mutantes Δ AVL49::Tn10(4), y Δ AVL70::Tn10(1). Para ello, mediante clonación se identificaron las secuencias flanqueantes al transposón

mini-Tn10 en los dos mutantes, y se determinó su localización en el genoma de la cepa LD-07. Con respecto al mutante Δ AVL49::Tn10(4), los numerosos intentos de localizar el punto de inserción del transposón resultaron fallidos, sin que podamos dar una explicación a este hecho. En lo relativo a Δ AVL70::Tn10(1), curiosamente el transposón truncó el gen regulador *luxO* (A0J46_06825) involucrado en el *quorum-sensing* en *Vibrio* spp. (Fig. IV.68C). Tal y como podemos observar en la Fig. IV.68C, LuxO forma parte de un operón junto con LuxU. LuxU es una quinasa que ante determinados estímulos (por ejemplo, baja densidad celular) se fosforila y seguidamente transfiere el grupo fosfato al regulador respuesta LuxO, el cual activará la transcripción de pequeños ARN reguladores que actúan sobre el regulador LuxR (Ball *et al.*, 2017). Es sabido que LuxO actúa como regulador de la luminiscencia en *V. harveyi* (Lilley and Bassler, 2000) y la formación de biofilm en *Aliivibrio fischeri* (Ray & Visick, 2012), pero tal vez, lo que más nos llame la atención es que la expresión de numerosas enzimas metabólicas está regulada por homólogos a LuxR, lo que sugiere un rol regulador del metabolismo por parte de *quorum-sensing* (Ball *et al.*, 2017). Así por ejemplo, la red de *quorum-sensing* de *V. parahaemolyticus* reprime un total de 64 genes asociados con el transporte y metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y lípidos (Kalburge *et al.*, 2017). En base a esta información, no es de extrañar que la mutación en *luxO* conlleve a una desregulación del metabolismo de lípidos exógenos en Δ AVL70::Tn10(1).

A pesar de nuestros reiterados intentos por encontrar mutantes por transposición deficientes en hidrólisis de tween 20, llevados a cabo en dos ocasiones con construcción y *screening* de sendas librerías de mutantes, y empleando como sustratos para la mutagénesis tanto la cepa AVL49 como la cepa AVL70 (Δ *lip80*), no hemos podido alcanzar el objetivo de localizar el gen responsable de la actividad lipolítica en tween 20 de *P. damsela* subsp. *damsela*. Por ello, realizamos una búsqueda de posibles lipasas/esterasas en el genoma de LD-07. Como resultado, hallamos la ORF A0J46_08280 anotada por el servidor RAST como lipasa/esterasa (Fig. IV.69). La base de datos ESTHER clasifica a esta enzima como una enzima lipolítica de

la familia IV, esterasas denominadas también como HSL por su similitud con las lipasas sensibles a hormonas descritas en mamíferos (Hemilä *et al.*, 1994).

Como era de esperar, A0J46_08280 muestra altos valores de similitud con α/β hidrolasas de *Photobacterium proteolyticum* (69% identidad, 91% de cobertura), *P. profundum* (67%, 93%) *P. aquae* (91%, 65%), *P. marinum* (91%, 68%), *P. jeanii* (69%, 90%), *P. sanguinancari* (67%, 91%), *P. swingsii* (67%, 91%), *P. ganghwense* (65%, 91%), *P. gaetbulicola* (65%, 91%) o de *Ferrimonas* spp. con valores de identidad del 90% y cobertura del 45%. También destaca la homología con la acetilesterasa/lipasa de *Vibrio hangzhouensis* (55% identidad, 89% cobertura). Además, esta posible enzima lipolítica no solo está presente en el genoma de LD-07, sino también en las cepas con actividad en tween 20 CIP 102761 (VDA_002140), RM-71 (A0J47_05040) y A-162 (A9D46_03660). En trabajos futuros sería interesante mutar por delección este gen y visualizar su fenotipo en tween 20.

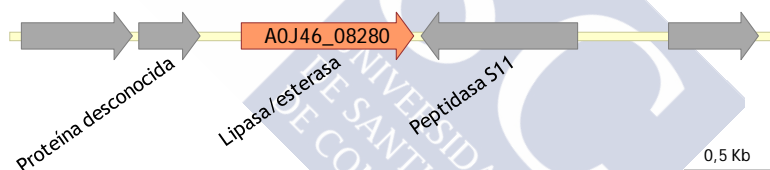


Fig. IV.69: Contexto genético de la posible lipasa/esterasa A0J46_08280 de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*.

4.6.4. Detección de la actividad lipolítica en *P. damsela* subsp. *damsela* mediante API ZYM: ¿es Lip80 una esterasa?

Atendiendo a la bibliografía, se podría decir que las enzimas lipolíticas se dividen en dos grandes grupos: las lipasas verdaderas y las esterasas o carboxilesterasas (Akoh *et al.*, 2004). Si bien a lo largo de este capítulo de resultados, e incluso en la literatura o en las anotaciones de los genomas, se ha utilizado indistintamente la nomenclatura lipasa a pesar de la posibilidad de estar frente a una esterasa, lo cierto es que este tipo de enzimas lipolíticas son diferentes. Entre otro tipo de características reflejadas en la Tabla IV.10, una de las diferencias distintivas entre lipasas y esterasas es la

especificidad de sustrato. Las lipasas (EC 3.1.1.3) son específicas para acilglicérols de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono), mientras que las esterases (EC 3.1.1.1) lo son para acilglicérols de cadena corta (< 10 átomos de carbono) y otros ésteres sencillos (Arpigny & Jaeger, 1999). A pesar de esta clasificación tan establecida, la realidad es mucho más complicada. Así por ejemplo, Plou *et al.* (1998) demostraron que tween 80, portador de ácido oleico, ácido graso monoinsaturado de 18 átomos de carbono, es un sustrato idóneo tanto para la detección de lipasas bacterianas como de esterases bacterianas. Asimismo, Jensen (1983), evidenciaron que los tweens pueden ser hidrolizados por esterases, dando como resultado falsos positivos para las lipasas.

Tabla IV.10: Diferencias generales entre lipasas y esterases. Información procedente de Bornscheuer (2002).

Propiedad	Lipasas (EC 3.1.1.3)	Esterases (EC 3.1.1.1)
Sustrato	Triglicéridos	Ésteres simples
Activación interfacial	Sí	No
Sustrato hidrofóbico	Alta	Alta o baja
Enantioselectividad	Generalmente alta	Alta o baja
Estabilidad en disolventes	Alta	Alta o baja

Con respecto a la capacidad lipolítica de *P. damsela* subsp. *damsela*, los estudios realizados hasta el momento no nos han permitido saber si la hidrólisis de tween 80 observada en la mayoría de los aislados, es debida a la acción de una lipasa o de una esterase, dado que, como acabamos de comentar, este medio es apto para la detección de ambas capacidades enzimáticas. Si bien es cierto que de manera rutinaria se emplean los medios tween para detectar la actividad lipolítica en un microorganismo, otro método de detección de actividad lipolítica que se ha empleado a la hora de caracterizar aislados de *P. damsela* subsp. *damsela*, es el sistema miniaturizado de detección enzimática API ZYM (Humble *et al.*, 1977). El API ZYM es un método semicuantitativo de determinación de actividades enzimáticas con 20 cúpulas que contienen un sustrato enzimático con un tampón. Una de las ventajas que nos aporta este micrométodo para el estudio de la actividad lipolítica de *P. damsela* subsp. *damsela*, es

la de permitirnos testar la presencia de enzimas con actividades lipolíticas diferentes: esterasas, lipasas-esterasas (la mayoría de las lipasas son perfectamente capaces de hidrolizar los sustratos de las esterasas) y lipasas. El fundamento se basa en la presencia de sustratos con diferente número de átomos de carbono, una de las características definitorias de las enzimas lipolíticas. De ese modo, se nombran como: i) esterasa, cuando sea capaz de hidrolizar el 2-naftil butirato (C_4) portado en el pocillo; ii) esterasa o lipasa, cuando hidrolice 2-naftil-caprilato (C_8); y iii) lipasa, cuando emplee 2-naftil-miristato (C_{14}). Destacamos que todos estos sustratos son ácidos grasos saturados.

Tal y como podemos observar en la Fig. IV.70, la cepa salvaje AVL49 (tween 80 y tween 20 positiva), es capaz de hidrolizar 2-naftil butirato (C_4) y 2-naftil-caprilato (C_8), es decir, sintetiza una o varias esterasas. Por el contrario no hidroliza 2-naftil-miristato, ácido graso de 14 átomos de carbono, y por lo tanto, no presenta actividad lipasa. A este respecto, y al igual que nuestros resultados, Fouz *et al.* (1993) detectaron en sus aislados de *P. damselae* subsp. *damselae* actividad esterasa pero no actividad lipasa. Asimismo, este patrón de resultados también se repetiría en las cepas caracterizadas por Labella *et al.* (2006), Khouadja *et al.* (2014) y Sharma *et al.* (2017). En contraposición, Labella *et al.* (2010a) detectaron cepas con actividad lipasa pero con valores de hidrólisis de sustrato bajos (< 5 nmoles de sustrato hidrolizado). Valiéndonos de esta información, decidimos a continuación realizar una comparativa de estas actividades lipolíticas detectadas por API ZYM de las cepas AVL69, AVL70 ($\Delta lip80$), AVL49::TnI0(1) ($\Delta fadL-lip80$) y AVL49::TnI0(4) (gen desconocido). De ese modo, como podemos apreciar en la Fig. IV.70, el mutante por delección AVL70 muestra, en comparación a la cepa parental AVL49, una menor cantidad de sustrato hidrolizado en lo relativo a las actividades esterasa y esterasa-lipasa. Con respecto al mutante por transposición del operón *fadL-lip80* (AVL49::TnI0(1)), vemos una pequeña disminución en sus actividades esterasa y esterasa-lipasa, relativamente semejante a la mostrada por AVL70. Curiosamente, el mutante desconocido AVL49::TnI0(4) ha perdido la

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

capacidad esterasa y muestra una actividad esterasa-lipasa muy baja. Como era de esperar, ninguno de ellos exhibe actividad lipasa.

En conjunto, estos resultados nos sugieren que la enzima lipolítica Lip80 responsable de la hidrólisis de tween 80 en *P. damselae* subsp. *damselae*, podría ser una esterasa. Asimismo, dado que *P. damselae* subsp. *damselae* parece carecer de actividad lipasa (o al menos, la incapacidad para hidrolizar un ácido graso de C₁₄), y de que el mutante AVL70 todavía sigue reflejando actividad esterasa, consideramos la existencia de otra esterasa cuya actividad se ve reflejada en la hidrólisis de tween 20. Futuros estudios enzimáticos con el uso de sustratos específicos para esterasas, como el p-nitrofenil acetato, serán necesarios para afirmar la clasificación de la enzima lipolítica Lip80 de *P. damselae* subsp. *damselae* como esterasa.

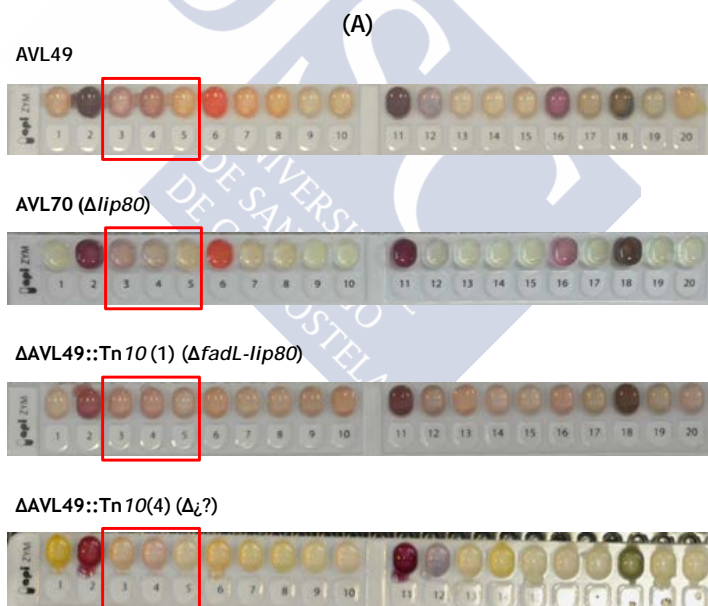


Fig. IV.70: Resultados de los API ZYM de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* indicadas. (A) Fotografías de las tiras de API ZYM. (B) Tabla con resultados cuantitativos de API ZYM. E En los recuadros rojos se señalan las enzimas lipolíticas analizadas. (0) reacción negativa; (1) 5 nmoles; (2) 10 nmoles; (3) 20 nmoles; (4) 30 nmoles; (5) >40 nmoles de sustrato hidrolizado.

(B)

API ZYM						
Nº pocillo	Enzima estudiada	Sustrato hidrolizado	AVL49	AVL70 ($\Delta lip80$)	Resultados AVL49::Tn10(1) ($\Delta fadL-lip80$)	AVL49::Tn10(4) ($\Delta i?$)
1	Control	-	0	0	0	0
2	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato	5	5	5	5
3	Esterasa (C_4)	2-naftil butirato (C_4)	3	1	1	0
4	Esterasa lipasa (C_8)	2-naftil-caprilato (C_8)	4	1	2	1
5	Lipasa (C_{14})	2-naftil-miristato (C_{14})	0	0	0	0
6	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamida	5	5	5	1-2
7	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida 2	1	1	0	0
8	Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida	1	0	1	0
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	0	0	0	0
10	α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	0	0	0	0
11	Fosfatasa ácida	2-naftil fosfato	5	5	5	5
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	1	1	3	4
13	α -galactosidasa	6-BR-2-naftil- α D-galactopiranosido	0	0	0	0
14	β -galactosidasa	2-naftil-BD-galactopiranosido	0	0	0	0
15	β -glucuronidasa	Naftol-AS-BI-BD-glucuronido	0	0	0	0
16	α -glucosidasa	2-naftil-BD-glucopiranosido	4	4	4	0
17	β -glucosidasa	6-BR-2-naftil-BD-glucopiranosido	0	0	0	0
18	N-acetil- β -glucosaminidasa	1-naftil-N-acetil-BD-glucosaminida	4	5	5	4
19	α -manosidasa	6-BR-2-naftil- α D-manopiranosido	0	0	0	0
20	α -fucosidasa	2-naftil- α L-fucopiranosido	0	0	0	0

Fig. IV.70 (Cont.): Resultados de los API ZYM de las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* indicadas. (A) Fotografías de las tiras de API ZYM. (B) Tabla con resultados cuantitativos de API ZYM. E En los recuadros rojos se señalan las enzimas lipolíticas analizadas. (0) reacción negativa; (1) 5 nmoles; (2) 10 nmoles; (3) 20 nmoles; (4) 30 nmoles; (5) >40 nmoles de sustrato hidrolizado.

4.7. ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD Y LOS EFECTOS EN LA VIABILIDAD CELULAR, DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA PHLYC, PLPV, Y COLP

La citotoxicidad se ha definido como el conjunto de los efectos adversos que resultan de la interferencia con estructuras y/o procesos esenciales para la supervivencia, proliferación y/o funciones celulares (Ekwall, 1983). La citotoxicidad es por lo tanto, la consecuencia de alteraciones no específicas de las funciones celulares basales (actividad mitocondrial, integridad de la membrana plasmática, etc), que pueden conducir a efectos adversos sobre las funciones específicas de las células y/o la muerte celular (Ekwall, 1983). A este respecto, los cultivos celulares se pueden emplear para seleccionar la toxicidad de una molécula, bien por estimación de las funciones basales de la célula o mediante pruebas en funciones celulares especializadas (Ekwall, 1983).

Los métodos empleados para la evaluación de la toxicidad celular inducida en modelos experimentales *in vitro* son variados y múltiples. Estas técnicas están basadas en criterios morfológicos, bioquímicos y metabólicos, y se pueden agrupar funcionalmente en tres categorías. La primera de las categorías corresponde a los métodos basados en la determinación de alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática. Entre ellos, se agrupan los procedimientos basados en el uso de colorantes (ensayos de exclusión de azul de tripán o eosina y el test del colorante MTT (bromuro de dimethylthiazol-difeniltetrazolio)), y en la determinación de la liberación de enzimas intracelulares (liberación de lactato deshidrogenasa celular). En la segunda categoría se agrupan los métodos basados en el análisis de la proliferación celular. Y con respecto a la última categoría, en ella se incluyen procedimientos variados tales como métodos cualitativos (microscopía óptica) y métodos cuantitativos como la determinación de la concentración de ATP intracelular. Asimismo, se emplean otras técnicas basadas en microscopia electrónica analítica, como por ejemplo, la determinación de la adherencia celular.

Con respecto a la citotoxicidad de *P. damsela* subsp. *damsela*, estudios previos ya han informado acerca de su capacidad para dañar cultivos celulares de peces y mamíferos (Fouz *et al.*, 1993; Wang *et*

al., 1998, Labella *et al.*, 2010a). Recientemente, Rivas *et al.* (2015a) estudiaron la citotoxicidad fulminante exhibida por las cepas portadoras de pPHDD1, demostrando el potencial tóxico de la fobalisina PhlyP y, en menor medida, el papel de PhlyC así como el de la fosfolipasa Dly. Con respecto a las cepas carentes del plásmido virulento, hasta la fecha, la base genética de la citotoxicidad exhibida (Fig. IV.3, del capítulo 4.1 de Resultados y Discusión) es desconocida. Por ello, decidimos evaluar el potencial citotóxico de los factores de virulencia descritos en el presente trabajo: la toxina formadora de poro PhlyC, la fosfolipasa PlpV y la collagenasa ColP. En la Tabla IV.11 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en este apartado, así como de los estudios llevados a cabo por diversos autores con las enzimas homólogas a PhlyC, PlpV y ColP. Los ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular elegidos, responden al estudio de parámetros morfológicos (integridad del tapiz celular y morfología celular), parámetros bioquímicos (ensayo de exclusión de azul de tripán) y parámetros metabólicos (contenido de ATP intracelular).

4.7.1. Parámetro morfológico: microscopía óptica

La alteración en el tapiz de las células eucariotas, así como las modificaciones en la morfología y en las conexiones celulares, son indicativos claros del efecto tóxico generado por un microorganismo, o por una molécula, sobre un cultivo celular. Los escasos estudios relativos a la citotoxicidad de *P. damsela* subsp. *damsela* se han centrado exclusivamente en analizar este tipo de perturbaciones. Así, Fouz *et al.* (1993) percibieron modificaciones en la monocapa celular y morfología de las líneas celulares de ratón L-929 y de pez RTG-2, tras su incubación con diversos aislados de *P. damsela* subsp. *damsela*. Si bien es cierto que todas las cepas analizadas habían mostrado toxicidad celular, no todas la causaban con los mismos valores, habiendo cepas con valores de citotoxicidad más elevados. Actualmente sabemos que esas diferencias vienen dadas, al menos en parte, por la presencia del plásmido virulento pPHDD1. Asimismo, Wang *et al.* (1998) confirmaron el mismo efecto citotóxico provocado por la cepa tipo CIP 102761, sobre las líneas celulares de peces EPC y

GF. Del mismo modo, las cepas caracterizadas por Labella *et al.* (2010a) mostraron actividad citotóxica, traducida en destrucción del tapiz celular y cambios morfológicos, tanto sobre líneas celulares de peces como de mamíferos.

En el presente estudio, hemos analizado el efecto de la cepa parental AVL49 y sus diferentes mutantes derivados, en la toxicidad contra la integridad del tapiz celular, morfología y conexiones celulares, en la línea epitelial de peces EPC (epitelioma papuloso de carpa). Para el ensayo de la citotoxicidad, se prepararon placas de 12 pocillos de cultivos celulares EPC y se incubaron a 20 °C hasta alcanzar la confluencia celular. Cada cepa bacteriana a ensayar se cultivó en placas de TSA-1 y posteriormente se resuspendió en solución salina (NaCl 0,85%) para alcanzar una DO₆₀₀ de 1,5, y se agregaron 0,2 mL de cada suspensión a cada pocillo de células EPC. Cada experimento se realizó por triplicado y se empleó solución salina como control negativo. El desarrollo de efectos citotóxicos fue observado después de 6, 24 y 48 h post-inoculación utilizando un microscopio de contraste de fase (sección 3.15.1 de Material y Métodos).

Tal y como se puede percibir en la Fig. IV.71, la cepa parental AVL49 mostró una destrucción total de la monocapa celular a las 12 horas después de la inoculación. Los cambios generados consistieron, principalmente, en la aparición de cúmulos de células redondeadas, pérdida del contacto intercelular y de adherencia, traducidos en la formación de aglutinados celulares que se desprendían fácilmente de la superficie del frasco de cultivo. Por el contrario, no se observó daño celular evidente en el mutante AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$), incapaz de sintetizar la hemolisina PhlyC, lo que sugiere que la toxina formadora de poros PhlyC es esencial para la toxicidad completa en las células EPC bajo las condiciones testadas (Fig. IV.71). Al igual que la fobalisina PhlyC, su homóloga VCC de *V. cholerae* desencadenó las mismas alteraciones mencionadas, pero en la línea celular de mamíferos HEK-293 (Castaño-Sánchez *et al.*, 2015). Por otro lado, la ausencia de efecto citotóxico sobre la línea EPC del mutante AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$), parece indicar que la fosfolipasa PlpV por sí sola no causa un efecto citotóxico detectable sobre el tipo celular analizado. Por el contrario,

la acción de las fosfolipasas TLH de *V. alginolyticus* y LDH de *V. parahaemolyticus* sí mostraron efectos tóxicos sobre los tapices de diversas líneas celulares (Wong *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012).

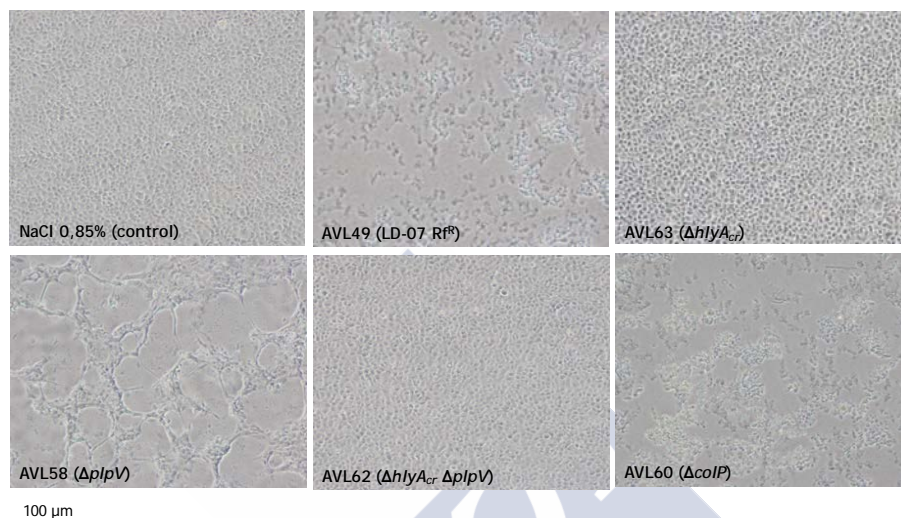


Fig. IV.71: Toxicidad para cultivos celulares EPC de la cepa parental AVL49 de *P. damsela* subsp. *damsela* y sus mutantes derivados para los genes cromosómicos que codifican la hemolisina PhlyC, la fosfolipasa PlpV y la collagenasa ColP.

Curiosamente, el mutante para la fosfolipasa PlpV (AVL58), que mantiene intacta la capacidad de producir PhlyC, causó un levantamiento parcial del tapiz celular, así como alargamientos dendríticos entre las células EPC (Fig. IV.71). Este dato plantea que PhlyC no es la única responsable del daño completo observado en la cepa parental AVL49, suscitando la hipótesis de que PhlyC y PlpV podrían actuar de forma sinérgica, resultando en una toxicidad celular completa. Por último, el doble mutante para los genes *hlyA_{cr}* y *plpV* (AVL62), que todavía produce la collagenasa ColP, no pudo causar daño celular detectable en el tapiz celular (Fig. IV.71). Este resultado, junto con la observación de que el mutante para *colP* (AVL60) desencadenó un daño en la monocapa celular comparable al causado por la cepa parental, plantea que la collagenasa ColP no tiene un efecto tóxico detectable en la línea celular estudiada. Al igual que la enzima ColP de *P. damsela* subsp. *damsela*, la collagenasa PrtV de *V.*

parahaemolyticus no originó cambios morfológicos en células de mamíferos. Por el contrario, la collagenasa VMC de *V. mimicus* sí dio lugar a alteraciones sobre una línea fibroblástica de salmón, así como VAC de *V. alginolyticus* en líneas celulares de mamíferos, y VppC de *V. parahaemolyticus* en células branquiales de platija (Tabla IV.11).

4.7.2. Parámetro bioquímico: exclusión del colorante azul de tripán

El azul de tripán (azul niágara, azul diamina, azul vital) es un colorante derivado de la toluidina que se caracteriza por poseer la capacidad de teñir células y tejidos muertos o dañados (Ehrlich & Shiga, 1904). El azul de tripán (AT) es una molécula polar, cuya carga eléctrica y tamaño le impiden atravesar las membranas celulares intactas, pero que va a penetrar en el interior celular cuando la integridad de éstas sea alterada por un elemento tóxico. El ensayo de tinción por exclusión mediante el colorante AT, corresponde al recuento de células eucariotas que no son capaces de incorporar el susodicho colorante.

Dado que *P. damsela* subsp. *damsela* ha sido descrito como un patógeno marino para una gran variedad de peces cultivados, decidimos emplear la línea celular fibroblástica de pez cebra AB.9. Asimismo, dado que la mayoría de las infecciones humanas causadas por *P. damsela* subsp. *damsela* se producen después de que una herida en la piel quedase expuesta a agua de mar (Rivas *et al.*, 2013a), con el fin de dilucidar si estas cepas son tóxicas para células humanas, se escogió además la línea celular de queratinocitos humanos HaCat.

Con la finalidad de estudiar el posible efecto de la fobalisina PhlyC y la fosfolipasa PlpV en cepas carentes de plásmido sobre la integridad de las membranas de las líneas celulares elegidas, incubamos cada una de ellas con la cepa AVL49 y sus mutantes derivados. En este ensayo empleamos una MOI (multiplicidad de infección) de 1:50 e incubamos la mezcla durante 90 min a 28 °C, en el caso de la línea celular de peces AB.9, y a 37°C para la línea celular humana HaCaT. Posteriormente, evaluamos la integridad de las membranas celulares mediante el recuento en cámara de Neubauer de

las células permeables al colorante AT, tras haber sido expuestas al mismo durante 10 min (sección 3.15.2 de Material y Métodos).

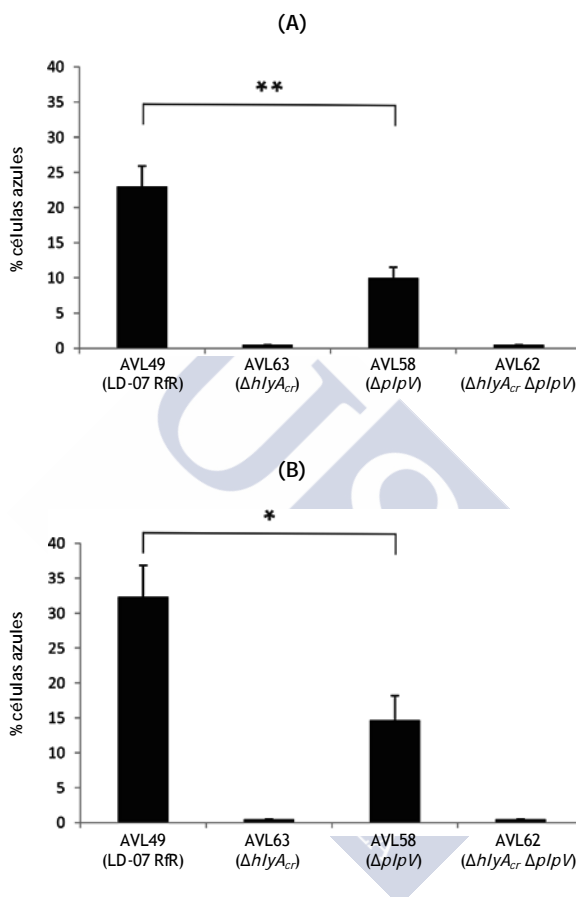


Fig. IV.72: Análisis de la integridad de membrana de las líneas celulares AB.9 (A) y HaCaT (B) infectadas con *P. damselae* subsp. *damselae* mediante el uso del colorante azul de tripán (AT). Las células fueron infectadas con las cepas indicadas a una MOI de 1:50, e incubadas durante 90 min a 28 °C (AB.9) o 37 °C (HaCaT). Posteriormente serían lavadas con PBS y teñidas durante 10 min con el colorante azul de tripán (concentración final, 0,2%). Las células positivas y negativas a AT se contaron en cada grupo ensayado y como grupos de 100 células (cuatro cuadrantes), obteniéndose un valor medio para cada cepa testada. Los datos finales son valores medios \pm SE, n=3. *, $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$. La significación estadística se determinó mediante una prueba t de Student de datos no apareados de dos colas.

Como resultado, observamos la entrada del colorante AT solo cuando las células eucariotas, tanto la línea de peces AB.9 como la humana HaCaT, fueron incubadas con cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* que sintetizaban la fobalisina PhlyC (Fig. IV.72). Concretamente, el 23% de las células AB.9 tratadas con la cepa parental eran azules, o lo que es lo mismo, estaban muertas o dañadas (Fig. IV.72A). En el caso de las células humanas HaCaT, este porcentaje aumentó hasta el 33% (Fig. IV.72B). Estos datos nos permiten afirmar que PhlyC es una toxina que desestabiliza la permeabilidad de las membranas permitiendo la interiorización del colorante. En apoyo de nuestros resultados obtenidos con la fobalisina PhlyC de la cepa carente de pPHDD1 AVL49, Rivas *et al.* (2015a) también demostraron la exclusión de azul de tripán por PhlyC en la cepa RM-71, portadora de pPHDD1, mostrando valores de toxicidad más bajos que PhlyP pero mayores que Dly (Tabla IV.11). Se cree que la diferencia de toxicidad observada entre PhlyC y PhlyP se debe a los residuos de aminoácidos que difieren entre las dos toxinas (una divergencia del 8% en la secuencia de aminoácidos), aunque este punto merece más investigación. Además, como acabamos de decir, su homóloga plasmídica PhlyP también provoca toxicidad detectada por entrada de AT en las líneas AB.9 y HaCaT. Asimismo, la hemolisina homóloga HlyA de *V. metschnikovii* mostró citotoxicidad en el ensayo de exclusión del colorante eosina (Tabla IV. 11).

El hecho de que el colorante azul de tripán, molécula relativamente pequeña (960 Da), pueda pasar a través de los poros generados por PhlyC, ya nos aporta información relativa al tamaño de los mismos. A pesar de que las hemolisinas homólogas PhlyP y VCC son clasificadas como toxinas de poro pequeño (de 0,5 a 5 nm de diámetro) (Los *et al.*, 2013), sus tamaños de poro difieren notablemente. Rivas *et al.* (2015a) demostraron que PhlyP crea poros en las membranas celulares con un diámetro >1,2 nm pero inferior a 3,0 nm, tamaño suficiente como para permitir la perfusión del AT. Por el contrario, la toxina homóloga VCC de *V. cholerae* horada poros de un diámetro mucho menor (0,9-1,0 nm) (Lohner *et al.*, 2009; De & Olson, 2011), por lo que el colorante no es capaz de atravesarlos (Rivas *et al.*, 2015a). Rivas *et al.* (2015a) sugieren que esta diferencia

en los tamaños de los poros entre PhlyP y VCC es debida a que PhlyP podría mostrar un canal transmembrana más ancho que el creado por VCC de *V. cholerae*, debido a la presencia en la zona más estrecha del barril- β de residuos de serina (S_{339}), aminoácido menos voluminoso que el residuo de triptófano (W_{343}) presentado por VCC en la misma posición (Fig. IV.19C, del capítulo 4.3 de Resultados y Discusión). Dado que PhlyC de la cepa AVL49, al igual que PhlyP, muestra el residuo serina en la zona más estrecha del barril- β , y además su acción permite la interiorización del azul de tripán, consideramos que la toxina PhlyC podría horadar poros en las membranas plasmáticas de un diámetro similar al de su homóloga plasmídica.

En lo relativo al mutante AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$), incapaz de sintetizar PhlyC pero sí la fosfolipasa PlpV, dada la ausencia de células azules, podemos afirmar que no afectó a la integridad de las membranas de las líneas celulares analizadas bajo las condiciones testadas (Fig. IV.72). Por el contrario, la fosfolipasa homóloga PlpA₂ de *V. vulnificus* sí ocasionó la entrada del colorante en macrófagos de ratón (Koo *et al.*, 2007).

Con respecto al mutante AVL58 (*plpV*), que sintetiza la hemolisina PhlyC pero no la fosfolipasa PlpV, el porcentaje de células azules fue menor con relación a la cepa parental AVL49, alcanzando valores del 9% en AB.9, y del 14% en la línea celular de humanos HaCaT (Fig. IV.72). Estos resultados podrían sugerir inicialmente, que la destrucción de la integridad de la membrana depende únicamente de PhlyC, pero curiosamente, el número de células permeables aumentó significativamente cuando ambas toxinas, PlpV y PhlyC, estaban presentes (Fig. IV.72). Como era de esperar, el doble mutante para *hlyA_{cr}* y *plpV* (AVL62) no generó ningún cambio detectable en la permeabilidad de las membranas eucariotas de ambas líneas celulares (Fig. VI.72). Esto también nos sugiere que ColP no muestra citotoxicidad, o al menos, no es detectable con este método bioquímico. Así por ejemplo, varias collagenasas homólogas sí han mostrado citotoxicidad evidenciada en el test del colorante MTT en líneas celulares de mamíferos y de peces (Tabla IV.11).

Estos datos implican que la destrucción de la integridad de la membrana depende de la actuación de PhlyC. Además, en

consonancia con los resultados de los ensayos de virulencia (Fig. IV.42, del capítulo 4.4 de Resultados y Discusión), los experimentos con AT han demostrado que PhlyC no es la única responsable de la toxicidad total exhibida por la cepa parental AVL49, como nos parecía indicar el ensayo con microscopia óptica, sino que se requiere de la fosfolipasa PlpV para una toxicidad completa.

4.7.3. Parámetro metabólico: análisis de la concentración de ATP celular

Si bien los resultados obtenidos con el experimento de azul de tripán ya nos sugieren el potencial citotóxico de PhlyC y PlpV en las líneas celulares AB.9 y HaCaT, decidimos realizar a continuación, un ensayo mucho más sensible y ampliamente utilizado por la comunidad científica para tal fin: la medición de ATP celular (Hipler, 2007; Riss *et al.*, 2011; Riss *et al.*, 2016). La medición de ATP intracelular utilizando la luciferasa de luciérnagas, es el método más comúnmente aplicado para estimar el número de células viables (Riss *et al.*, 2011; Riss *et al.*, 2016). Cuando las células ven alterada la integridad de su membrana, pierden la capacidad de sintetizar ATP, por lo que las ATPasas endógenas agotan rápidamente cualquier ATP restante en el citoplasma. De esta manera, el agotamiento de ATP y la disminución de su síntesis son consecuencias frecuentes en este tipo de daños celulares (Riss *et al.*, 2011; Riss *et al.*, 2016). El método consiste en cuantificar el ATP intracelular que todavía no se ha consumido tras la incubación de las células eucariotas con un elemento potencialmente tóxico. En este apartado hemos determinado el daño celular en las líneas celulares AB.9 y HaCaT tratadas con los productos extracelulares de la cepa AVL49 y sus mutantes derivados, empleando el protocolo descrito por Haugwitz *et al.* (2006) (ver Material y Métodos 3.15.3).

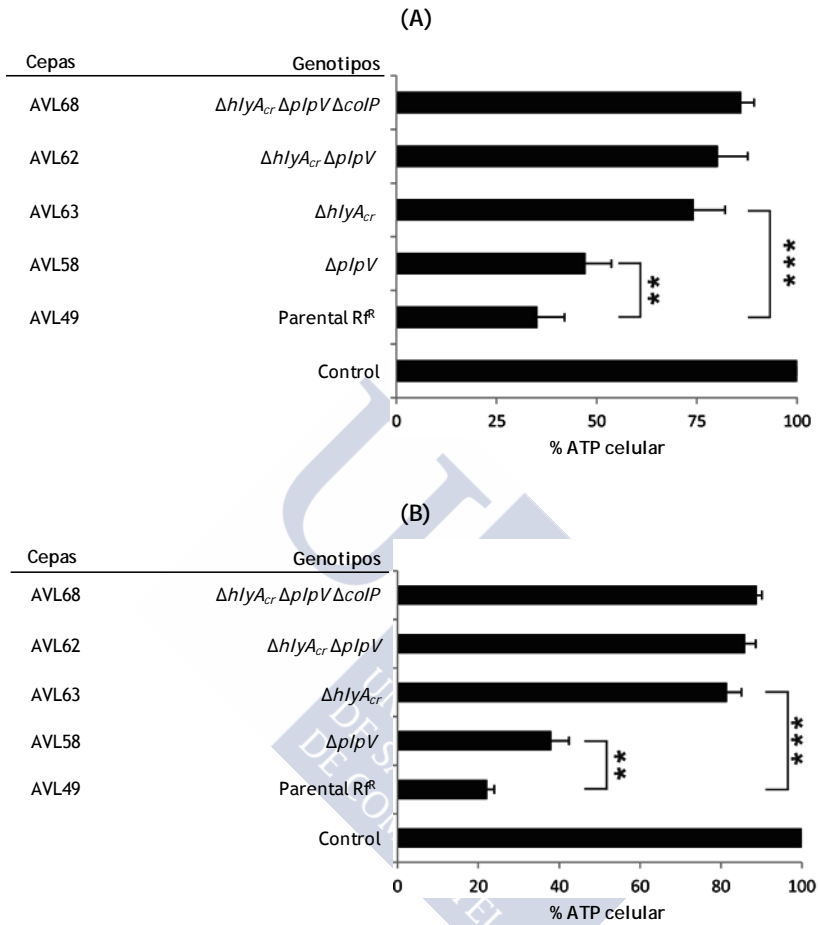


Fig. IV.73: Pérdida de ATP en células tratadas con *P. damsela* subsp. *damsela*. Las líneas celulares AB.9 (A) y HaCaT (B) se incubaron a 28 °C y 37 °C, respectivamente, durante 90 min con los ECPs de las cepas indicadas (400 µg/mL de proteína total). El control es medio de cultivo sin células. Valores medios ± SE, n=3. **, P < 0,01, *** P ≤ 0,001. La significación estadística se determinó mediante una prueba t de Student de datos no apareados de dos colas.

Como se puede observar en la Fig. IV.73A, los productos extracelulares de la cepa parental AVL49 (400 µg/mL de proteína total) disminuyeron el ATP celular al 35% en la línea de peces AB.9, después de 90 min de incubación. Este pérdida de ATP fue menor en las células tratadas con los productos extracelulares de la cepa mutante

$\Delta plpV$ (AVL58), en la que el ATP celular se redujo al 47%. Como era de esperar, los ECPs de AVL63 ($\Delta hlyA_{cr}$) redujeron el ATP celular al 74% (Fig. IV.73A), confirmando el papel principal de la hemolisina PhlyC en la citotoxicidad en peces de las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* sin pPHDD1. Al igual que PhlyC, la acción de las fobalisinas PhlyP y PhlyC en cepas portadoras de pPHDD1 también redujeron los niveles de ATP intracelular en la línea AB.9 (Tabla IV.11). Otro ejemplo de toxina formadora de poro cuya citotoxicidad ha sido analizada a través de la concentración de ATP celular, es la hemolisina homóloga VHH de *V. mimicus* (Li *et al.*, 2005).

Al igual que sucedía con el ensayo de azul de tripán, el efecto citotóxico observado cuando los dos factores de virulencia PhlyC y PlpV están actuando en conjunto, es mayor que cuando PhlyC está actuando sin la presencia de la fosfolipasa. Con respecto al doble mutante AVL62 ($\Delta hlyA_{cr} \Delta plpV$), éste demostró ser más tóxico que la cepa triple mutante AVL68 ($\Delta hlyA_{cr} \Delta plpV \Delta colP$), con respecto al agotamiento del ATP celular de AB.9 (Fig. IV.73A), en donde las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En lo relativo a la línea celular humana HaCaT, los datos mostrados son muy similares a los observados en la línea de peces AB.9, pero a pesar de ello, es necesario resaltar que los productos extracelulares de AVL49 causaron niveles de toxicidad más altos en la línea celular de humanos que en la de peces (disminución de ATP celular del 78% frente al 65%, respectivamente) (Fig. IV.73B). A una conclusión similar llegaría Rivas *et al.* (2015a), quienes demostraron que las fobalisinas PhlyC y PhlyP de cepas portadoras de pPHDD1 eran más tóxicas para líneas celulares de humanos que de peces.

En conjunto, nuestros resultados indican que la hemolisina formadora de poro PhlyC es la única toxina con capacidad de alterar la integridad de la membrana, y que la fosfolipasa PlpV no solo es tóxica, sino que también mejora la actividad de PhlyC contra las células humanas y de peces. Además, dado que la sensibilidad de las toxinas dependerá tanto de la susceptibilidad de las células tratadas como de las características moleculares de la enzima, no sería de extrañar que PlpV o ColP mostrasen efecto citotóxico en otras líneas celulares.

Tabla IV.11: Participación de PhlyC, PlpV y ColP en la citotoxicidad de *P. damsela* subsp. *damsela*, y homólogos respectivos en *Vibrio* spp. (PI) yoduro de propidio; (LDH) lactato deshidrogenasa; (MTT) bromuro de dimethylthiazol-difeniltetrazolio.

ENZIMA	ESPECIE PRODUCTORA	LINEAS CELULARES	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	RESULTADO DEL ENSAYO	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
TOXINAS FORMADORAS DE PORO					
PhlyC (AU046_02 O60)	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (carentes de pPHDD1)	-EPC (epitelioma papuloso de carpa) -AB.9 (fibroblastos de pez cebra) -HaCaT (queratinocitos de humano)	-Microscopia óptica -Exclusión del colorante azul de tripan -[ATP celular]	Citotoxicidad detectada	El presente trabajo
PhlyC (VDA_0024 Z0)	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (portadora de pPHDD1)	-AB.9 (fibroblastos de pez cebra) -HaCaT (queratinocitos de humano)	-Exclusión de azul de tripan -[ATP celular]	Citotoxicidad detectada	Rivas et al. (2015a)
PhlyP	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (portadoras de pPHDD1)	-AB.9 (fibroblastos de pez cebra) -HaCaT (queratinocitos de humano)	-Microscopia óptica -Exclusión de azul de tripan -Actividad de LDH -[ATP celular] -Pérdida de K ⁺ -Análisis de influjo PI y citometría de flujo -Morfología mitocondrial -Adherencia celular al soporte	Citotoxicidad detectada (excepto en LDH)	Rivas et al. (2015a)
VCC	<i>V. cholerae</i>	-Hela (epitelial derivada de carcinoma de cérvix uterino humano) -Vero (epitelial derivadas de riñón de mono verde africano) -BHK (fibroblástica de riñón de hámster) -AB.9 (fibroblastos de pez cebra) -HaCaT (queratinocitos de humano)	-Microscopia óptica -Exclusión de azul de tripan -Actividad de LDH -Análisis de influjo PI y citometría de flujo -Citotoxicidad vacuolizante	Citotoxicidad detectada (excepto en exclusión de azul de tripan - influjo de PI y eflujo de LDH)	Moschioni et al. (2002) Castañón-Sánchez et al. (2015) Rivas et al. (2015a)
VNH	<i>V. mimicus</i>	-T84 (epiteliales de carcinoma colónico humano)	-[ATP celular]	Citotoxicidad detectada	Li et al. (2005)
VFH	<i>V. fluvialis</i>	-THP-1 (células monocitomaqurofágicas humanas) -IC-21 (macrófagos de ratón) -BMW (macrófagos derivados de médula ósea de ratón) -PM (macrófagos peritoneales del ratón)	-Actividad de LDH	Citotoxicidad detectada	Song et al. (2015)
HlyA	<i>V. metschnikovii</i>	-CHO (células epiteliales ováricas de hámster) -Vero (epitelial derivadas de riñón de mono verde africano)	-Exclusión del colorante eosina	Citotoxicidad detectada	Miyake et al. (1988)

ENZIMA	ESPECIE PRODUCTORA	LÍNEAS CELULARES	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	RESULTADO DEL ENSAYO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
FOSFOLIPASAS					
PipV (AOJ46_07665)	P. damsela subsp. damsela (carentes de pPHDD1)	-EPC (epitelioma papuloso de carpa) -AB.9 (fibroblastos de pez cebra) -HaCaT (queratinocitos de humano)	-Microscopia óptica -Exclusión del colorante azul de tripan - [ATP celular]	Citotoxicidad detectada en exclusión de azul de tripan y [ATP celular]	El presente trabajo
TLH	V. alginolyticus	-Eritrocitos de dorada	-Microscopia óptica -Análisis de la apoptosis y necrosis celular	Citotoxicidad detectada	Wong et al. (2012)
PipA2	V. vulnificus	- Macrófagos de ratón	-Exclusión de azul de tripan	Citotoxicidad detectada	Koo et al. (2007)
VHH	V. harveyi	- FG (células branquiales de platija)	- Test del colorante MTT	Citotoxicidad detectada	Zong et al. (2006)
LDH	V. parahaemolyticus	-Hela (epitelial derivada de carcinoma de cérvix uterino humano) -RAW 264.7 (macrófagos de murinos)	-Método morfológico: microscopia óptica - Test del colorante MTT	Citotoxicidad detectada	Wang et al. (2012)
PHIA	V. mimicus	- CHSE-214 (fibroblastos de salmón)	-Actividad de LDH	Citotoxicidad detectada	Lee et al. (2002)
COLAGENASAS					
ColP (AOJ46_07665)	P. damsela subsp. damsela (carentes de pPHDD1)	-EPC (epitelioma papuloso de carpa) -AB.9 (fibroblastos de pez cebra) -HaCaT (queratinocitos de humano)	-Microscopia óptica -Exclusión del colorante azul de tripan - [ATP celular]	Sin citotoxicidad detectada	El presente trabajo
VMC	V. mimicus	-CHSE-214 (fibroblastos de salmón)	-Microscopia óptica -Actividad de LDH	Citotoxicidad detectada	Lee et al. (2003)
PrIV	V. parahaemolyticus	-CHO (células epiteliales ováricas de hámster) - Hela (epitelial derivada de carcinoma de cérvix uterino humano) -Vero (epitelial derivadas de riñón de mono verde africano)	-Microscopia óptica - Test del colorante MTT	Sin citotoxicidad detectada	Yu et al. (2000)
VAC	V. alginolyticus	-CHO (células epiteliales ováricas de hámster) - Hela (epitelial derivada de carcinoma de cérvix uterino humano) -Vero (epitelial derivadas de riñón de mono verde africano)	-Microscopia óptica. - Test del colorante MTT	Citotoxicidad detectada	Yu et al. (2000)
VppC	V. parahaemolyticus	- FG (células branquiales de platija)	-Microscopia óptica. - Test del colorante MTT	Citotoxicidad detectada	Luan et al. (2007)

4.7.4. Estudio del posible efecto sinérgico entre la fosfolipasa PlpV y la hemolisina cromosómica PhlyC

Tal y como se acaba de describir, el estudio de la citotoxicidad de los factores de virulencia PhlyC y PlpV parece indicar una relación sinérgica establecida entre la toxina formadora de poro y la fosfolipasa. El término sinergia define un proceso en el que uno o más factores en un sistema tienen actividad lítica intrínseca, y los factores combinados causan la lisis de eritrocitos a una velocidad mayor que la suma de las tasas individuales (Beecher *et al.*, 2000). Durante una relación sinérgica, una enzima lipolítica podría trabajar mano a mano con otra enzima, o podría optimizar las condiciones para la actuación de otras enzimas (Stehr *et al.*, 2003). En la literatura, varios son los ejemplos de relaciones sinérgicas entre toxinas formadoras de poro y fosfolipasas. En cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* portadoras de pPHDD1, la acción de la fosfolipasa D con actividad esfingomielinasa Dly, favorece la acción formadora de poro de las hemolisinas PhlyC y PhlyP (Rivas *et al.*, 2013b). Dly reconoce las moléculas de esfingomielina, y PhlyP y PhlyC las zonas de la membrana donde se halla embebido el colesterol. La damselisina, debido a su actividad esfingomielinasa, libera las cabezas polares de colina dejando más accesible el colesterol para el reconocimiento de las fobolisinas (toxinas dependientes de colesterol) (Rivas *et al.*, 2013b; Rivas *et al.*, 2015a). Esto explica el aumento de la hemólisis en sangre de oveja ocasionada por PhlyP y PhlyC ante la presencia de Dly (Rivas *et al.* (2013b). Asimismo, en los macrófagos murinos, el escape del patógeno intracelular facultativo *Listeria monocytogenes* requiere de las actuaciones conjuntas de la toxina formadora de poro listeriolisina O (Portnoy *et al.*, 1992) y de las fosfolipasas C PI-PLC y PC-PLC (Camilli *et al.*, 1993; Poussin *et al.*, 2009).

Con el fin de analizar la aparente relación sinérgica establecida entre PlpV y PhlyC, estudiamos la actividad hemolítica en sangre de oveja y trucha, así como la actividad fosfolipasa en yema de huevo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para ello hicimos crecer a los mutantes AVL58 y AVL63, deficitarios en la producción de fosfolipasa PlpV y hemolisina PhlyC, respectivamente, en placas agar sangre y yema de huevo, de tal manera que ambas cepas creciesen próximas. Los resultados mostrados en la Fig. IV.74 no revelan un aumento en el halo hemolítico ocasionado por PhlyC al combinarse con la fosfolipasa PlpV en eritrocitos de oveja, ni tampoco de la hemólisis de PlpV en conjunción con PhlyC en sangre de trucha. Del mismo modo, la actividad fosfolipasa de PlpV no se ve mejorada ante la presencia de la toxina formadora de poro PhlyC. Si bien los datos obtenidos en el estudio de la citotoxicidad han reflejado una posible relación sinérgica entre PlpV y PhlyC en cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1, hasta el momento se desconoce la naturaleza de la misma.

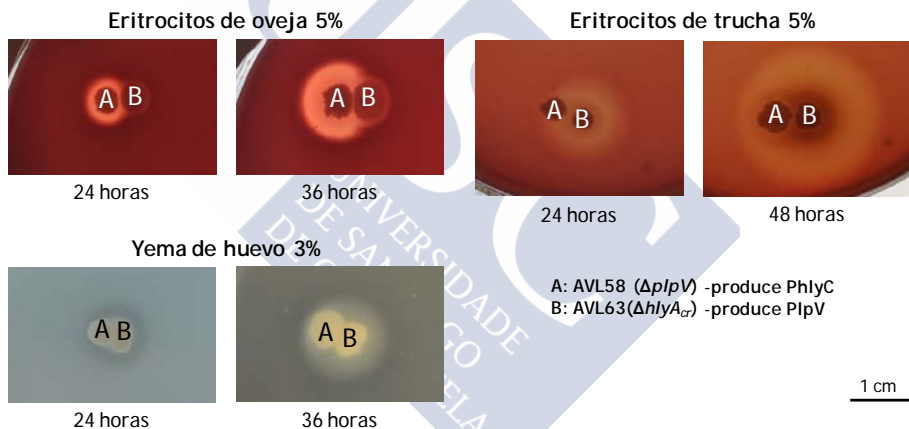


Fig. IV.74: Estudio de la relación sinérgica entre la fosfolipasa PlpV (AVL63) y la hemolisina PhlyC (AVL58) de *P. damsela* subsp. *damsela*.

4.8. SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO II: CLAVE PARA LA SECRECIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA PHLYC, PLpV Y COLP

En las bacterias han evolucionado un notable número de vías o sistemas destinados al transporte de sustratos a través de la envoltura celular. Estos sistemas son complejos multiproteicos que constituyen nanomáquinas que permiten intercambios regulados con el medio extracelular. Las proteínas que actúan como sustratos cumplen diversas funciones como la motilidad, la adquisición de nutrientes o la comunicación intercelular. Sin embargo, las bacterias patógenas emplean también estas maquinarias para la secreción de toxinas o enzimas hidrolíticas durante la colonización del hospedador (Durand *et al.*, 2009). Bien es sabido, por lo tanto, que la secreción de factores de virulencia mediada por la actuación de los sistemas de secreción, es un paso determinante en la virulencia de numerosos patógenos bacterianos (Gutiérrez *et al.*, 2014; Cianciotto & White, 2017). Diversas especies de *Vibrio* patógenas de humanos (*V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* o *V. metschnikovii*) también producen y secretan enzimas proteolíticas (Miyoshi, 2013).

Los sistemas de secreción de bacterias Gram negativas, son los elementos encargados de liberar las enzimas a través de un transporte vectorial del interior celular al medio extracelular. Estos se clasifican atendiendo a la naturaleza de la maquinaria de transporte y las reacciones que las enzimas catalizan. Hasta el momento se han identificado siete sistemas de secreción denominados Tipo I, II, III, IV, V, VI y VIII, y adicionalmente los distintos tipos de pilus (*chaperon-usher* (CU), pili tipo IV, pili tipo V, pili conjugativo o fibras curli) presentes en la superficie de las bacterias Gram negativas (Costa *et al.*, 2015; Green & Mecsas, 2016; Hospenthal *et al.*, 2017). Asimismo, estos tipos se pueden subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se emplee para el transporte a través de la membrana plasmática: las vías Sec/Tat-dependientes, que exportan la proteína lineal o plegada al espacio periplásmico, respectivamente; y la vías Sec/Tat-independientes, en las que los sustratos se translocan directamente desde el citoplasma hasta el espacio extracelular sin que sea necesaria la presencia de un

transportador intermediario periplásmico (Green & Mecsas, 2016). De ese modo, podemos incluir en las vías Sec/Tat-dependientes a los sistemas de secreción tipo II, V, VIII y CU o fibras de curli; y en la vía Sec/Tat-independientes a los de tipo I, III, IV, VI y VIII (Green & Mecsas, 2016).

Tal y como se ha demostrado en los resultados anteriores, la toxina formadora de poro PhlyC y las enzimas hidrolíticas PlpV y ColP, son enzimas secretadas por la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* (Δ pPHDD1), que contribuyen a la patogenicidad en lubina y la toxicidad en líneas celulares. Dado el escaso conocimiento de la secreción proteica en *P. damsela* subsp. *damsela*, decidimos iniciar el estudio de la translocación de los factores de virulencia PhlyC, PlpV y ColP en cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* carentes de pPHDD1.

4.8.1. Identificación mediante transposición con mini-Tn10 del SSTII como el responsable de la secreción de PhlyC

A pesar de que el papel de los factores PhlyC, PlpV y ColP de *P. damsela* subsp. *damsela* en la virulencia en lubina ha sido descrito a lo largo del presente trabajo, nada sabemos acerca de cómo la bacteria los secreta al medio extracelular. Comenzamos el estudio de los mecanismos de secreción de dichos factores de virulencia con el análisis de la toxina formadora de poro PhlyC. Para ello, decidimos analizar la actividad hemolítica de una colección de mutantes por transposición en la cepa AVL49 (LD-07R^f) de *P. damsela* subsp. *damsela* (sección 3.8.3 de Material y Métodos). Planteamos emplear una estrategia que consiste en la mutagénesis aleatoria con el transposón mini-Tn10 (Herrero *et al.*, 1990), obteniendo una librería de mutantes en LD-07, y buscando genes candidatos en aquellos mutantes que no presenten un halo hemolítico.

Una vez se obtuvo la librería de mutantes por transposición con mini-Tn10 en la cepa AVL49, los clones se crecieron durante 24 horas a 25 °C en placas de agar sangre (Oxoid). Aquellos mutantes Tn10 que mostraron cambio en el halo hemolítico en placa fueron candidatos a contener inserciones en genes relacionados con la actividad hemolítica de PhlyC. Se identificaron varios mutantes, y se

descartaron todos aquellos que no rindieron un amplicón de PCR del tamaño esperado para el gen *hlyA_{cr}* intacto, dado que se trataría de mutantes candidatos a contener el transposón insertado en el propio gen de la hemolisina. Finalmente, se seleccionó un único mutante que sí contenía el gen *hlyA_{cr}* intacto, con una disminución drástica del fenotipo hemolítico, al que denominamos AR203 (Fig. IV.75).

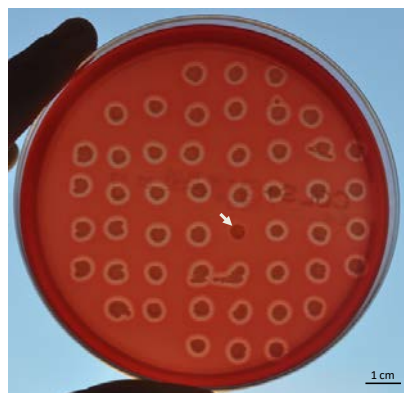


Fig. IV.75: Ensayo de las actividades hemolíticas de mutantes Tn10 de la cepa AVL49 de *P. damsela* subsp. *damsela*, tras 24 horas de incubación a 25 °C. La flecha señala el clon AR203 con baja actividad hemolítica. El ensayo se realizó en placas de agar sangre de cordero (Oxoid). Escala de referencia, 1 cm.

El siguiente paso a seguir fue el de identificar qué gen estaba inactivado en el mutante AR203 por la inserción del transposón mini-Tn10. Para ello, mediante clonación (sección 3.8.3.2 de Material y Métodos) se identificaron las secuencias flanqueantes al transposón mini-Tn10 en el mutante AR203, y tras la predicción de la ORF, se determinó su localización en el genoma de la cepa LD-07. Curiosamente, el transposón se insertó en el mutante AR203 de hemólisis reducida (Fig. IV.76A) en un gen que codifica una proteína cuya secuencia aminoacídica predicha presentó un 41% de identidad con la proteína EpsL de *Vibrio cholerae* (Fig. IV.76B). EpsL es un componente de membrana interna del Sistema de Secreción tipo II (SSTII) de bacterias Gram negativas (Korotkov *et al.*, 2012). La búsqueda *in silico* en el genoma de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* reveló que *epsL* forma parte de un operón de 12 genes de 11,2 Kb de tamaño, *epsCDEFGHIJKLMN* (A0J46_13350-A0J46_13405), anotado por el servidor RAST como componente del SSTII (Fig. IV.76A).

El SSTII está compuesto por un total de 12-15 proteínas que generalmente están agrupadas en un solo operón. Este sistema es responsable de la translocación de proteínas plegadas desde el espacio periplásmico al medio extracelular (Korotkov *et al.*, 2012). Esta vía, también conocida bajo el nombre de sistema general de secreción, es la encargada de la secreción de una gran cantidad de toxinas y enzimas hidrolíticas (Sandkvist, 2001). La secreción a través de este sistema sucede en dos etapas. En primer lugar, la vía Sec o Tat transloca el sustrato marcado con péptido señal, del citosol hacia el espacio periplásmico a través de la membrana plasmática. En el segundo paso, en el periplasma la proteína pierde el péptido señal por actuación de una peptidasa y adquiere su conformación nativa, para ser posteriormente secretada al medio extracelular a través de la membrana externa por una estructura multiproteica denominada secretón (Fig. IV.76C). Estructural y funcionalmente, los componentes del secretón forman cuatro subconjuntos: un canal de membrana externa formado por la secretina (EpsD), una plataforma de proteínas asociadas con la membrana citoplasmática (EpsC, EpsF, EpsL y EpsM), un conjunto de proteínas que se ensamblan en una estructura similar a un pilus, el pseudopilus, en el periplasma (EpsG, EpsH, EpsI, EpsJ y EpsK), y una ATPasa citoplasmática (EpsE) (Fig. IV.76BC). El pseudopilus, mediante ciclos de extensión y retracción dentro del periplasma, es el encargado de impulsar las moléculas efectoras a través de la secretina al medio extracelular. Por su parte, la plataforma de proteínas asociadas a la membrana citoplasmática actúa como punto de anclaje del pseudopilus y la ATPasa citoplasmática aporta la energía necesaria para el proceso (Kulkarni *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015). Todos estos componentes del SSTII de diversas especies están muy conservados entre sí, mostrando homologías estadísticamente significativas, lo que revela la gran conservación entre especies de este sistema de secreción. Muchas bacterias Gram negativas utilizan la vía de secreción de tipo II para secretar las proteínas que contribuyen a la enfermedad en seres humanos, animales e incluso plantas (Korotkov *et al.* 2012). Ejemplos de bacterias patógenas que emplean el SSTII para la secreción de factores de virulencia son *V. cholerae* (Sikora, 2013), *V. vulnificus* (Hwang *et*

al., 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (Bleves *et al.*, 2010), *Legionella pneumophila* (Cianciotto, 2013), *Aeromonas hydrophila* (Jiang & Howard, 1992) o *Klebsiella pneumoniae* (Pugsley *et al.*, 1986).

Además de los genes estructurales del sistema de translocación, durante el proceso de secreción mediada por el SSTII se requiere de la participación de las proteínas accesorias EpsA y EpsB. En *P. damsela* subsp. *damsela*, al igual que en *V. cholerae*, los genes *epsA* y *epsB* (A0J46_12795-A0J46_12800) se agrupan en un operón separado del operón principal *epsCDEFGHIJKLMN* (Fig. IV.76A). Por el contrario, en especies como *E. coli* o *Aeromonas hydrophila* *epsAB* forman parte del operón principal (Sandkvist *et al.*, 1997; Douzi *et al.*, 2012). Otro de los elementos necesarios para el correcto funcionamiento del SSTII, es la peptidasa-metiltransferasa EpsO, encargada de escindir el péptido señal y de la metilación de los monómeros de pseudopilina. Como podemos observar en la Fig. IV.76A, el operón principal del SSTII de *P. damsela* subsp. *damsela* no posee el gen *epsO*, al igual que le sucede a *V. cholerae* (Sandkvist *et al.*, 1997) y a *V. vulnificus* (Paranjpye & Strom, 2005). Por el contrario, *P. damsela* subsp. *damsela* sí presenta en su genoma el gen *pilD* (A0J46_18680) de la peptidasa-metiltransferasa de pilinas, dispuesto en el operón *pilABCD* de biogénesis de pilus tipo IV (Marsh & Taylor, 1998; Paranjpye & Strom, 2005) (Fig. IV.76A). Dado que el SSTII y el pilus tipo IV presentan un ancestro común (Hobbs & Mattick, 1993), y que componentes del SSTII presentan equivalentes estructurales con el sistema pilus tipo IV (Ayers *et al.*, 2010), se ha dado el caso de que la peptidasa prepilina PilD del pilus tipo IV, actúa también sobre las pseudopilinas EpsG, EpsH, EpsI, EpsJ y EpsK del SSTII (Campos *et al.*, 2013).

El análisis comparativo mediante BlastP de todos los componentes del SSTII de *P. damsela* subsp. *damsela* reveló una homología estadísticamente significativa (con valores *e* próximos a 0), con el resto de las proteínas constituyentes de dicho sistema en *V. cholerae* (Fig. IV.76B), permitiéndonos obtener una representación estructural del SSTII en *P. damsela* subsp. *damsela* que facilite el entendimiento de dicho aparato de secreción (Fig. IV.76C). Señalamos además, que en el resto de los genomas de *P. damsela*

subsp. *damselae* comparados también está presente el SSTII descrito para la cepa LD-07 (cepa CIP 102761 (*epsAB*: VDA_002947-VDA_002946, *epsC-N*: VDA_003123- VDA_003114, *pilD*: A0J47_12175), cepa RM-71 (*epsAB*: A0J47_12665-A0J47_12670, *epsC-N*: A0J47_13215-A0J47_13270, *pilD*: A0J47_12175) y cepa A-162 (*epsAB*: A9D46_10035-A9D46_10040, *epsC-N*: A9D46_11055-A9D46_11110, *pilD*: A9D46_11180).

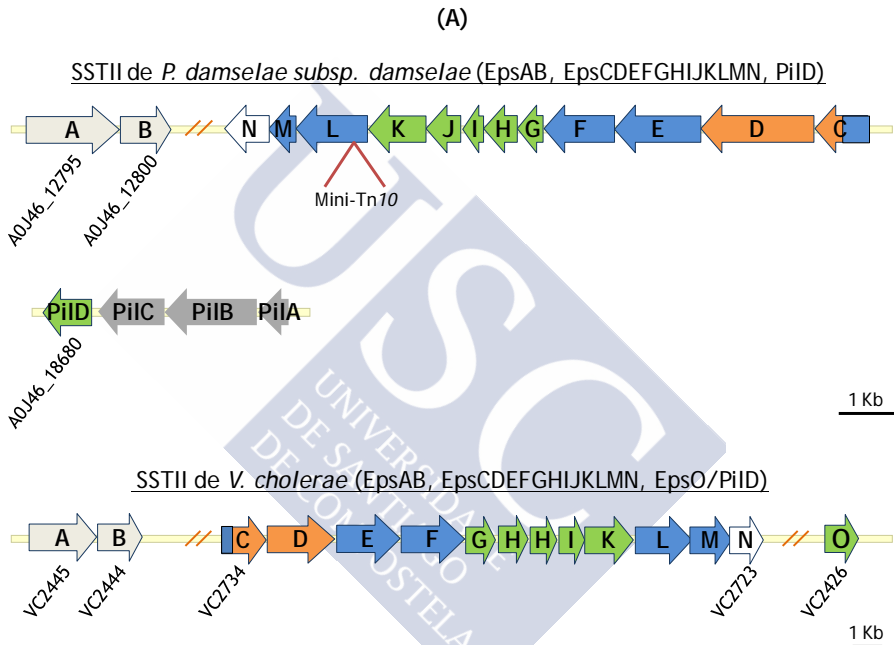


Fig. IV.76: (A) Organización genética de los operones del SSTII localizados en la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* y descritos en *V. cholerae* (Douzi *et al.*, 2012). En color blanco se muestran los componentes de función desconocida (*EpsAB*, *EpsN*), en azul los componentes *EpsEFLM* de la plataforma de membrana interna (MI), en naranja las proteínas *EpsCD* de membrana externa (ME) y en verde las pseudopilinas *EpsGHIJK* y la peptidasa-metiltransferasa *PilD*. Se indican los códigos proteicos y el punto de inserción del mini-Tn10 en el gen *epsL* del mutante AR203. Las barras de escala representan 1 Kb de tamaño.

(B)

SSTII de <i>Vibrio cholerae</i>			SSTII de <i>Pdd</i>	
Código proteína	Nombre proteína	Función proteína	% id. /%cob.	Código proteína
Operón EpsAB				
VC2445	EpsA	Unión a peptidoglicano	44%/99%	A0J46_12795
VC2444	EpsB	Función desconocida	27%/68%	A0J46_12800
Operón EpsCDEFGHIJKLMN				
VC2734	EpsC	Plataforma de MI, interacción con secretina	43%/97%	A0J46_13350
VC2733	EpsD	Secretina de ME	66%/100%	A0J46_13355
VC2732	EpsE	ATPasa citoplasmática	80%/97%	A0J46_13360
VC2731	EpsF	Plataforma de MI	68%/99%	A0J46_13365
VC2730	EpsG	Pseudopilina principal	81%/97%	A0J46_13370
VC2729	EpsH	Pseudopilina	45%/94%	A0J46_13375
VC2728	EpsI	Pseudopilina	60%/99%	A0J46_13380
VC2727	EpsJ	Pseudopilina	49%/100%	A0J46_13385
VC2726	EpsK	Pseudopilina	54%/99%	A0J46_13390
VC2725	EpsL	Plataforma de MI	41%/99%	A0J46_13395
VC2724	EpsM	Plataforma de MI	48%/99%	A0J46_13400
VC2723	EpsN	Función desconocida	43%/100%	A0J46_13405
PilID				
VC2426	PilID	Peptidasa y N-metiltransferasa de prepilinas	62%/99%	A0J46_18680

(C)

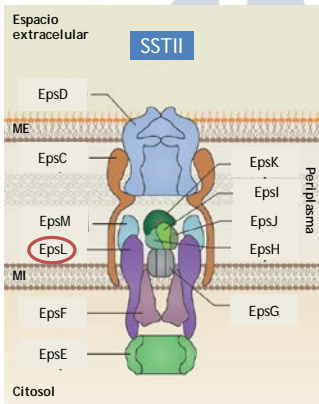


Fig. IV.76 (Cont.): (B) Análisis comparativo de los componentes proteicos del SSTII de *P. damsela* subsp. *damsela* (*Pdd*) en relación al SSTII de *V. cholerae* (%id.: porcentaje de identidad; %cob.: porcentaje de cobertura). (C) Representación esquemática del SSTII de *P. damsela* subsp. *damsela*. En círculo rojo se señala el gen truncado por la inserción del mini-Tn10. Imagen modificada de Costa *et al.* (2015) (con permiso de Springer Nature).

Para confirmar la asociación entre la inactivación del gen estructural *epsL* y el fenotipo hemolítico claramente disminuido observada en el mutante AR203, construimos un mutante por

intercambio alélico en la cepa LD-07Rf^R (AVL49), obteniendo la cepa AR211 (LD-07Rf^R Δ *epsL*). Asimismo, dado que el SSTII parece precisar de la intervención de la peptidasa-metiltransferasa de prepilinas PilD, codificada en el operón del pilus tipo IV *pilABCD*, decidimos realizar también un mutante por intercambio alélico del gen *pilD* (A0J46_18680), y así confirmar su participación en la secreción de proteínas a través del SSTII. Los cebadores empleados para la construcción de los mutantes AR211 (Δ *epsL*) y AR240 (Δ *pilD*) se describen en la Tabla III.6 de Material y Métodos.

Al analizar la hemólisis en placas de agar sangre de cordero de los mutantes AR211 (Δ *epsL*) y AR240 (Δ *pilD*), se observaron halos hemolíticos similares al presentado por el mutante por transposición mini-Tn10 (AR203) (Fig. IV.77). La complementación de los mutantes con los genes *epsL* y *pilD* clonados en los plásmidos pAVL529 y pAVL531, respectivamente, restauró los halos hemolíticos (Fig. IV.77). Los cebadores empleados para la complementación de estos genes se indican en la Tabla III.7 de Material y Métodos. Puesto que PhlyC es la única enzima con actividad hemolítica sobre eritrocitos de oveja producida por la cepa LD-07, estos resultados claramente indican que *epsL*, y por lo tanto el Sistema de Secreción Tipo II, desempeña un papel importante en la secreción de PhlyC en *P. damsela* subsp. *damsela*. Igualmente, el análisis del mutante para el gen *pilD* demuestra que esta peptidasa-metiltransferasa es necesaria para la escisión del péptido señal de las pseudopilinas constitutivas del SSTII, y por lo tanto, para la secreción del factor de virulencia PhlyC.

Al igual que la citolisina VCC homóloga de *V. cholerae* (Sikora *et al.*, 2011) y la damsellisina y PhlyP de *P. damsela* subsp. *damsela* (Rivas *et al.*, 2015b), y en contraposición a la toxina formadora de poro HlyA de *E. coli*, la cual es transportada mediante el SSTI (Fath & Kolter, 1993), la toxina formadora de poro PhlyC de *P. damsela* subsp. *damsela* es secretada al espacio extracelular a través del Sistema de Secreción de tipo II.

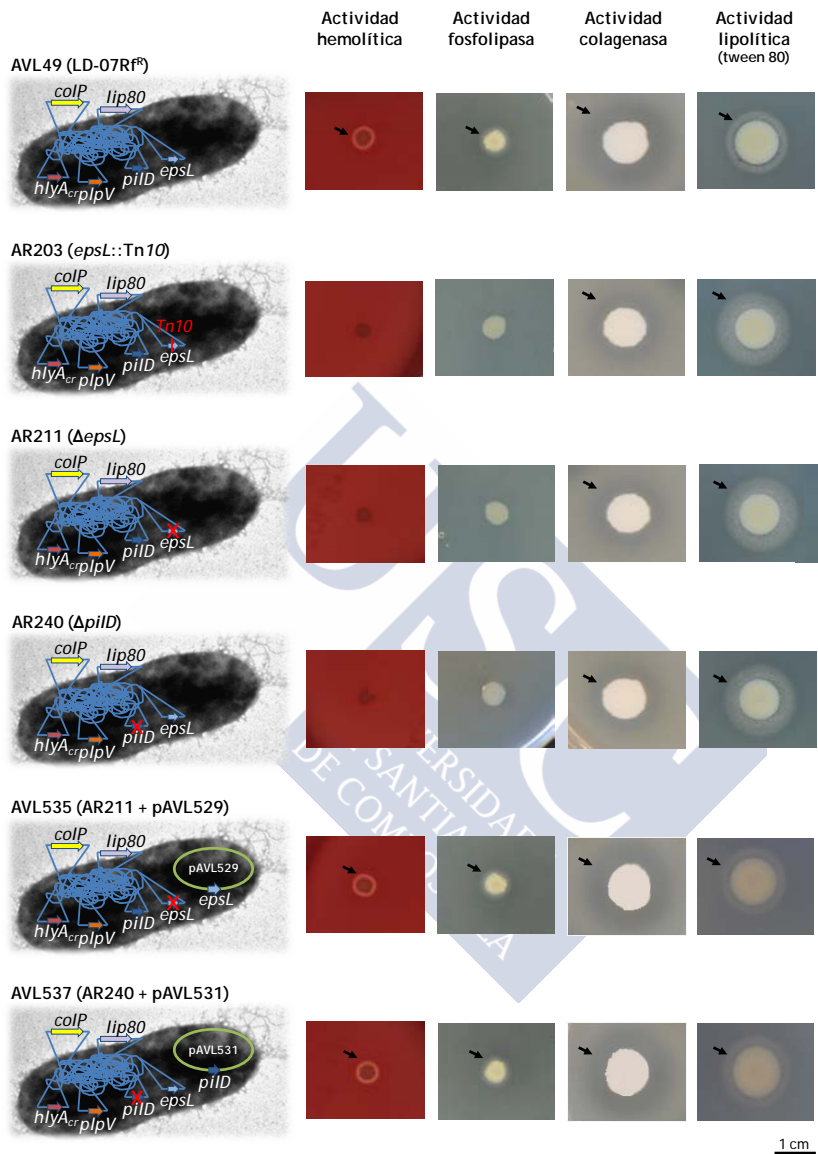


Fig. IV.77: Efectos de las delecciones de los genes *epsL* y *pilD* de la cepa LD-07, en las actividades de la hemolisina PhlyC, la fosfolipasa PlpV, la collagenasa ColP y la enzima lipolítica Lip80, en los medios en placa correspondientes. Se indican los nombres de las cepas y sus correspondientes genotipos. Los mutantes de *epsL* y *pilD* fueron complementados con los genes *epsL* y *pilD* clonados en los plásmidos pAVL529 y pAVL531, respetivamente. La barra de escala representa 1 cm de tamaño.

4.8.2. El sistema general de secreción tipo II está implicado además, en la secreción de la fosfolipasa PlpV y la collagenasa ColP

El SSTII es capaz de transportar hacia el medio extracelular una amplia gama de sustratos (Sandkvist, 2001; Korotkov *et al.*, 2012; Cianciotto & White, 2017). Aunque en algunas especies bacterianas esta vía solo participa en la secreción de una única proteína, en otras, el número puede llegar a aumentar a las quince, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (Bleves *et al.*, 2010) o hasta más de veinte como por ejemplo en *V. cholerae* (Sikora, 2013). Dado que el SSTII de *P. damsela* subsp. *damsela* está implicado en la secreción de la toxina formadora de poro PhlyC, y que proteasas, lipasas o fosfolipasas son liberadas al medio extracelular a través de este sistema en diversas especies bacterianas (Korotkov *et al.*, 2012), decidimos estudiar si la fosfolipasa PlpV, la collagenasa ColP y la enzima lipolítica Lip80 de *P. damsela* subsp. *damsela* son translocadas a través de esta vía.

4.8.2.1. Análisis *in silico* de los péptidos señal de las enzimas extracelulares PhlyC, PlpV, ColP y Lip80

Como ya se ha mencionado previamente, el Sistema de Secreción de tipo II es el responsable de la secreción de proteínas plegadas desde el espacio periplásmico al medio extracelular. Una de las características presentes en las proteínas exportadas a través del SSTII, es la presencia de un péptido señal en el extremo amino terminal, que las señala para su viaje hacia el espacio periplásmico y que será eliminado por la actuación de una peptidasa específica (Green & Mecsas, 2016).

Mediante el empleo del método de predicción SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011), que consigue diferenciar entre las proteínas citoplasmáticas y las secretadas a través de vías dependientes de Sec, se ha identificado la presencia de péptidos señal en los extremos N-terminal de PhlyC, PlpV, ColP y Lip80, así como los puntos de escisión sobre los que actúan las peptidasas encargadas de eliminarlos de la proteína madura (Fig. IV.78). El hecho de que el péptido señal se localice en el extremo N-terminal ya nos aporta el indicio de que su

secreción puede llegar a realizarse a través de los SSTII, SSTIII o SSTV, dado que en los SSTI y SSTIV el péptido señal se presenta en el extremo C-terminal, y en el SSTVI no se conoce péptido señal (Green & Mecsas, 2016). Este servidor nos aporta el valor *D-score* (valor de discriminación), empleado para discriminar péptidos señal de péptidos no señal. Para las proteínas no secretadas, todas las puntuaciones (*score*) en la salida de SignalP deberían ser muy bajas (cerca del valor objetivo negativo de 0,1). PhlyC, PlpV, ColP y Lip80 muestran unos *D-score* de 0,832, 0,808, 0,808 y 0,676, respectivamente, así como un *D-score* del punto de corte de 0,570 en todas ellas, lo que claramente sugiere que estas enzimas presentan un péptido señal (Fig. IV.78A).

(A)

Enzima	SignalP 4.0 (<i>D-score</i>)	SecretomeP (<i>SecP-score</i>)	MatureP	Secreción SSTII (comprobación empírica)
PhlyC	0,832	0,944	Secretada	Sí
PlpV	0,808	0,754	Secretada	Sí
ColP	0,808	0,754	Secretada	Sí, parcialmente
Lip80	0,676	0,947	Secretada	No

(B)

PhlyC MKIRKLYSCILLGLSSLSASA**I**ADVDNYSTGADAISILSSVQ (22)

PlpV MTHILKYSAIAFILSSSA**SV**AATNCEDIAQLAHVPDKASVIEH (21)

ColP MTHILKYSAIAFILSSSA**SV**AATNCEDIAQLAHVPDKASVIEH (21)

Lip80 MKKHYLALIIAASL**G**LTACGGDSKTTGTPTVNPDIADSLKAE (15)

Fig. IV.78: (A) Resumen de los valores obtenidos por cada método de predicción de secreción empleado sobre las distintas enzimas. (B) Péptidos señal en los extremos N-terminal de PhlyC, PlpV, ColP y Lip80 predichos por SignalP. Se resalta en el recuadro rojo el péptido señal de la hemolisina PhlyC secretada por el SSTII. Las posiciones de escisión pronosticadas para cada enzima se representan como letras de mayor tamaño en negrita. Los residuos leucina y alanina que sugieren un procesamiento dependiente de Sec se indican en color verde y naranja, respectivamente. Entre paréntesis se indica la longitud en aminoácidos de cada péptido señal.

Dado que las proteínas que son secretadas a través de vías de secreción no clásicas (independientes de péptido señal) no pueden ser identificadas correctamente utilizando métodos de predicción como SignalP, decidimos emplear el predictor SecretomeP (Bendtsen *et al.*,

2005). Asimismo, el método SecretomeP también es capaz de discriminar proteínas citoplásmicas de proteínas secretadas clásicas (portadoras de péptidos señal Sec clásicos). El servidor bioinformático SecretomeP, exhibió una puntuación SecP de 0,944 para PhlyC, 0,754 para PlpV y ColP y 0,947 para Lip80, donde las puntuaciones SecP > 0,5 indican una posible secreción no clásica (Fig. IV.78A). A pesar de que SecretomeP está diseñado para predecir la secreción no clásica, por lo general asigna una puntuación alta a las proteínas que emplean la vía de secreción clásica. Por otro lado, el servidor MatureP (Orfanoudaki *et al.*, 2017), predictor bioinformático que diferencia las proteínas secretadas a través de la vía Sec de las proteínas citoplásmicas, también considera a estas enzimas como enzimas secretadas dependientes de la vía Sec, prediciendo como péptidos señal las mismas secuencias aminoacídicas diagnosticadas por SignalP y SecretomeP (Fig. IV.78B). En conjunto, estos resultados nos sugieren que, al igual que la hemolisina PhlyC, las enzimas PlpV, ColP y Lip80 podrían ser secretadas al medio extracelular a través del Sistema de Secreción tipo II, o al menos a través de alguno de los otros sistemas de secreción dependientes de Sec.

Como hemos comentado anteriormente, las proteínas secretadas a través del SSTII pasan del periplasma hacia el medio extracelular, por lo que es necesario que en primer lugar atraviesen la membrana interna. Para ello, la vía de secreción de tipo II precisa de la participación de las vías Sec o Tat (Voulhous *et al.*, 2001). La vía Sec (secreción general), es la responsable de la secreción de proteínas lineales (Beckwith, 2013), y la vía Tat (*twin-arginine translocation*), de la translocación de proteínas ya plegadas (Palmer & Berk, 2012) (Fig. IV.79B). El genoma de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* presenta distribuidos en distintas posiciones del cromosoma I (más abajo, Fig. IV.87), los genes integrantes de la vía Sec (SecA, SecB, SecD, SecE, SecF, SecY, SecZ y SecY), así como los elementos necesarios para la secreción por la vía Tat (TatABC) (Fig. IV.79A). Al igual que la cepa LD-07, en el resto de los genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* analizados también se han localizado estos genes en el cromosoma I (datos no mostrados).

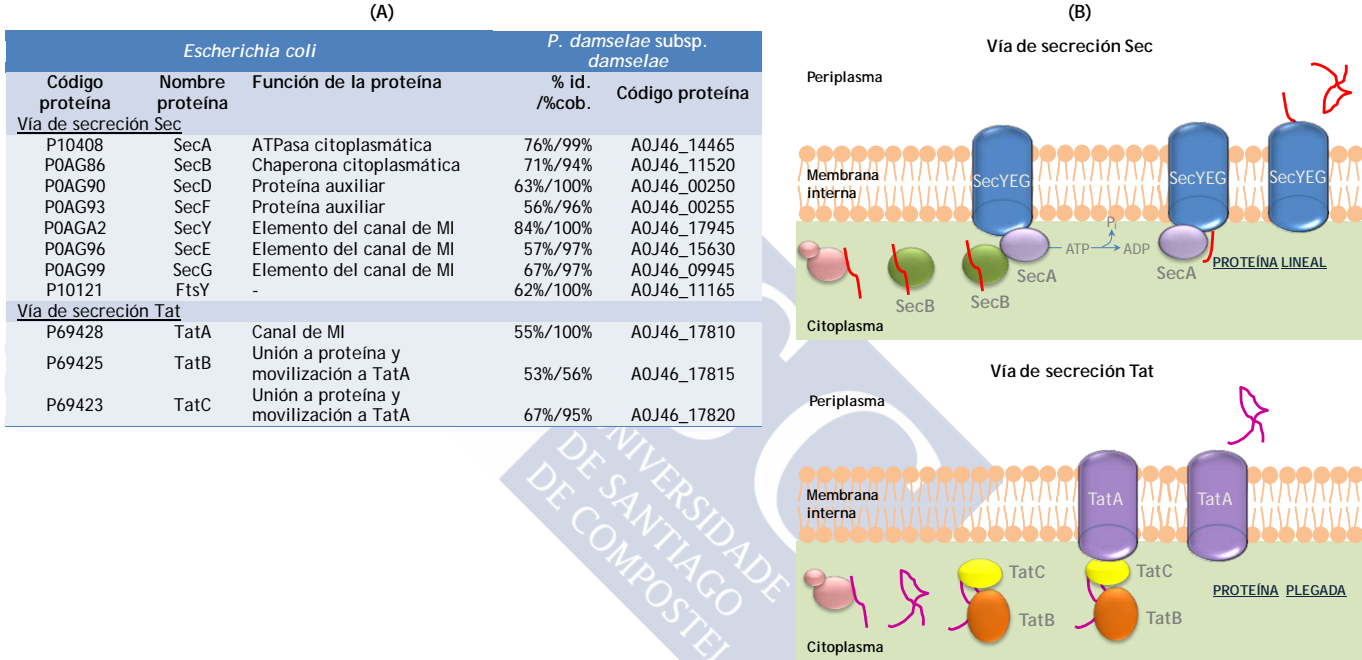


Fig. IV.79: (A) Tabla de homologías entre los sistemas Sec y Tat presentes en *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997) y los localizados en el genoma de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* (%id.: porcentaje de identidad; %cob.: porcentaje de cobertura). (B) Translocación de proteínas a secretar del citoplasma celular al espacio periplásmico mediante las vías Sec y Tat (Vía de secreción Sec: SecB impide el plegamiento proteico y SecA es una ATPasa que proporciona energía al proceso de translocación que va a suceder a través del canal de membrana interna (MI) formado por SecYEG. Vía de secreción Tat: TatB y TatC se unen al péptido señal de la proteína a secretar, trasladándolo hacia el canal de membrana interna TatA responsable de la exportación). Imagen elaborada a partir de la información procedente de Green & Mecsas (2016).

El hecho de que una proteína secretada emplee una vía u otra está indicado en su péptido señal. De este modo, las proteínas que empleen el mecanismo Sec van a presentar péptidos señal con leucina y alanina como residuos más abundantes. Por el contrario, los péptidos señal de la vía Tat contienen altos niveles de glicina pero menos de leucina (Cristobal *et al.*, 1999). Las enzimas PhlyC, PlpV, ColP y Lip80, muestran péptidos señal con relaciones leucina/glicina de 5/1, 2/0, 2/0 y 3/1, respectivamente. Además, tal y como podemos observar en la Fig. IV.78B, al igual que el péptido señal de PhlyC secretada por el SSTII, las secuencias de PlpV, ColP y Lip80 presentan leucina y alanina como aminoácidos más abundantes. Por otro lado, las proteínas secretadas por la vía Tat se caracterizan por presentar en su péptido señal el patrón Z-R-R-x-Φ-Φ, donde Z es cualquier residuo polar y Φ representa residuos hidrofóbicos (Natale *et al.*, 2008). PhlyC, PlpV, ColP y Lip80 no muestran este motivo es sus péptidos señal (Fig. IV.78B).

En base a estas predicciones, hipotetizamos que PlpV, ColP y Lip80 podrían ser secretadas a través de un sistema de secreción dependiente de Sec, y que tal vez, al igual que la hemolisina PhlyC, este sistema sea el SSTII.

4.8.2.2. La secreción de la fosfolipasa PlpV y la collagenasa ColP está mediada por el SSTII

Teniendo en cuenta el análisis *in silico* de los péptidos señal realizado en la sección anterior, decidimos analizar las actividades de la fosfolipasa PlpV, la collagenasa ColP y la enzima lipolítica Lip80 en los mutantes para el Sistema de Secreción tipo II de *P. damsela* subsp. *damsela*, AR211 ($\Delta epsL$) y AR240 ($\Delta pilD$), y las comparamos con los fenotipos de la cepa salvaje AVL49 y del mutante por transposición AR203. En las placas de agar TSA-1 suplementadas con sus respectivos sustratos (3% de yema de huevo, 3% de gelatina, 1% de tween 80) añadimos de cada cepa una gota de 10 μ L de volumen procedente de cultivos bacterianos a una DO_{600} de 1. Incubamos a 25° C durante 24 horas en el caso de la fosfolipasa, y 48 horas en los casos de la collagenasa y enzima lipolítica.

Como se aprecia en la Fig. IV.77, los mutantes para los genes *epsL* y *pilD* del SSTII (AR211 y AR240) exhiben pérdida de la actividad fosfolipasa, una menor actividad collagenolítica y una mayor actividad lipolítica en tween 80, con respecto a la cepa parental AVL49. Estos fenotipos coinciden con los observados en el mutante por transposición AR203 (Fig. IV.77). La complementación de los mutantes por intercambio alélico AR211 ($\Delta epsL$) y AR240 ($\Delta pilD$) con su gen nativo (clonados en los plásmidos pAVL529 y pAVL535, respectivamente) restableció los patrones enzimáticos mostrados por la cepa parental AVL49 (Fig. IV.77).

Estos resultados demuestran que la fosfolipasa PlpV, al igual que su homóloga PlpA₂ de *V. vulnificus* (Jang *et al.*, 2017), es exportada al medio extracelular únicamente a través del SSTII. En lo relativo a la collagenasa ColP, al igual que su homóloga VchC de *V. cholerae* (Park *et al.*, 2015), es secretada, al menos en parte, a través del SSTII. Si bien por el momento desconocemos cuál es la otra vía que participaría en la secreción de ColP, sería factible diseñar experimentos para conseguir identificarla, basados en la mutagénesis por transposición con mini-Tn10 de los mutantes AR211 o AR240. En lo relativo a Lip80, si bien existen ejemplos de lipoproteínas secretada a través del SSTII en *Y-proteobacteria* (Zückert, 2014), no es el caso de esta enzima lipolítica. Pride *et al.* (2013) sugirieron que la lipoproteína homóloga en *V. cholerae* VolA, podría anclarse en la membrana externa a través del sistema Lol. El sistema Lol (*lipoprotein outer membrane localization*), está destinado al anclaje de lipoproteínas en la cara interna de la membrana externa. Este sistema está compuesto por el complejo LolCDE en la membrana interna (similar a los transportadores ABC), la chaperona periplásmica LolA y el receptor de membrana externa LolB (Zückert, 2014). El sistema Lol es dependiente de Sec/Tat (Zückert, 2014), de ahí que los métodos bioinformáticos de predicción empleados nos hayan sugerido el carácter secretor de Lip80. *P. damsela* subsp. *damsela* presenta en su genoma todos los genes del sistema Lol (LolA: A0J46_07015; LolB: A0J46_18305, y LolCDE: A0J46_02735-A0J46_02745), por lo que futuros trabajos enfocados en la mutagénesis de alguno de sus componentes nos aportarían más información.

4.8.3. ¿Existen otras enzimas secretadas por el SSTII en *P. damsela* subsp. *damsela*?

Interesados en conocer qué otro tipo de proteínas exportadas podrían estar empleando el sistema de secreción de tipo II para su translocación al medio extracelular en la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*, decidimos llevar a cabo una comparación entre los perfiles obtenidos del sistema de identificación API 20E y del sistema para la determinación de la actividad enzimática API ZYM, entre la cepa salvaje AVL49 y el mutante para el gen estructural *epsL* AR211.

Tal y como podemos percibir en la Fig. IV.80A, no encontramos grandes diferencias en las capacidades enzimáticas estudiadas en el sistema API ZYM entre la cepa salvaje y el mutante. Las cepas AVL49 y AR211 ($\Delta epsL$) son positivas para las enzimas fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa-lipasa (C8), leucina arilamilasa, valina arilamilasa, cistina arilamilasa, tripsina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa, α -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa. Si bien es cierto, las enzimas esterasa C4, valina arilamilasa, cistina arilamilasa y N-acetil- β -glucosaminidasa, presentan concentraciones mayores en la cepa mutante AR211 con respecto a la cepa salvaje. Curiosamente, si tenemos presente la Fig. IV.77, observamos que el mutante AR211 muestra un mayor precipitado en la hidrólisis de tween 80 que la cepa salvaje, dato que se constata también en la prueba de la esterasa C4.

Con respecto a los perfiles obtenidos en API 20E, la cepa salvaje AVL49 y el mutante AR211 son capaces de llevar a cabo las mismas reacciones enzimáticas analizadas (Fig. IV.80B). De ese modo, ambas cepas descarboxilan los aminoácidos arginina (ADH) y lisina (LDC), hidrolizan la urea gracias a la acción de la ureasa (URE), llevan a cabo la fermentación butanodiólica del piruvato (VP), así como la fermentación/oxidación de glucosa (GLU), y presentan citocromo c oxidasa (OX).

En resumen, el análisis de los perfiles de los sistemas miniaturizados API ZYM y API 20E de la cepa mutante para el gen *epsL* del SSTII AR211, no nos ha aportado información adicional relativa al secretoma de LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* dependiente de SSTII.

(A) API ZYM

LD-07Rf^R (AVL49)



LD-07Rf^R Δ *epsL* (AR211)



API ZYM			
Nº pocillo	Enzima estudiada	Resultados	
		AVL49 (LD-07Rf ^R)	AR211 (Δ <i>epsL</i>)
1	Control	0	0
2	Fosfatasa alcalina	5	5
3	Esterasa (C 4)	3	4
4	Esterasa lipasa (C 8)	4	4
5	Lipasa (C 14)	0	0
6	Leucina arilamidasa	5	5
7	Valina arilamidasa	1	3
8	Cistina arilamidasa	1	2
9	Tripsina	0	0
10	α -quimotripsina	0	0
11	Fosfatasa ácida	5	5
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	1	1
13	α -galactosidasa	0	0
14	β -galactosidasa	0	0
15	β -glucuronidasa	0	0
16	α -glucosidasa	4	4
17	β -glucosidasa	0	0
18	N-acetil- β -glucosaminidasa	4	5
19	α -manosidasa	0	0
20	α -fucosidasa	0	0

(0) reacción negativa (1) 5 nmoles (2) 10 nmoles (3) 20 nmoles (4) 30 nmoles (5) >40 nmoles

Fig. IV.80: Resultados de las pruebas miniaturizadas API ZYM (A) y API 20E (B) de la cepa salvaje AVL49 y del mutante para el gen estructural *epsL* del SSTII (AR211). La lectura de los resultados se llevó a cabo tras 24 horas de incubación a 25 °C. En las tablas se indican las reacciones enzimáticas/enzimas que se examinan en cada sistema API. Se resaltan en azul claro las pruebas enzimáticas que son diferenciales entre las cepas ensayadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(B) API 20E



API 20E			
Pocillo	Enzima/Reacción estudiada	Resultados	
		AVL49 (LD-07Rf ^R)	AR211 (Δ <i>epsL</i>)
ONPG	B-galactosidasa	-	-
ADH	Arginina deshidrolasa	+	+
LDC	Lisina descarboxilasa	+	+
ODC	Ornitina descarboxilasa	-	-
CIT	Utilización del citrato	-	-
H ₂ S	Producción de H ₂ S	-	-
URE	Ureasa	+	+
TDA	Triptófano desaminasa	-	-
IND	Producción de indol	-	-
VP	Producción de acetoína	+	+
GEL	Gelatinasa*	-	-
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa	+	+
MAN	Fermentación/oxidación de manitol	-	-
INO	Fermentación/oxidación de inositol	-	-
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol	-	-
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa	-	-
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa	-	-
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa	-	-
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina	-	-
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa	-	-
OX	Citocromo oxidasa	+	+

(+) reacción positiva (-) reacción negativa

Fig. IV.80 (Cont.): Resultados de las pruebas miniaturizadas API ZYM (A) y API 20E (B) de la cepa salvaje AVL49 y del mutante para el gen estructural *epsL* del SSTII (AR211). La lectura de los resultados se llevó a cabo tras 24 horas de incubación a 25 °C. En las tablas se indican las reacciones enzimáticas/enzimas que se examinan en cada sistema API. *La actividad gelatinasa de ColP no se detecta en API 20E.

4.8.4. ¿Existen otros Sistemas de Secreción en la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*?

La presencia de sistemas de secreción en los genomas de bacterias patógenas, y no patógenas, es muy relevante para su supervivencia, dado que muchas de las proteínas que secretan están relacionadas con la adquisición de nutrientes o la comunicación intercelular, entre otros procesos (Durand *et al.*, 2009). Con la finalidad de tener una visión amplia de los posibles sistemas de secreción presentes en la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*, iniciamos una búsqueda *in silico* de los diversos tipos de sistemas de secreción descritos en bacterias Gram negativas, empleando como referencia, sistemas de secreción bacterianos descritos en la literatura.

4.8.4.1. Búsqueda del Sistema de Secreción tipo I

El Sistema de Secreción tipo I (SSTI) se caracteriza por transportar los sustratos en un proceso de un solo paso a través de las membranas interna y externa (Green & Mecsas, 2016). Uno de los SSTI mejor estudiados es el encargado de la secreción de la hemolisina HlyA de *Escherichia coli* (Thomas *et al.*, 2014). Este sistema de secreción consta de una proteína auxiliar HlyC, un componente de membrana interna de la familia de los transportadores ABC (HlyB), una proteína de fusión a membrana (HlyD), y una proteína canal de membrana externa o TolC (Thomas *et al.*, 2014). Empleando como referencia los elementos proteicos de este SSTI (Fig. IV.81), realizamos una búsqueda de proteínas homólogas en la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*.

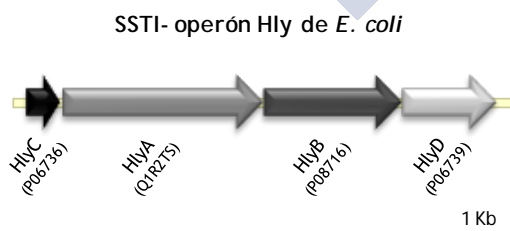


Fig. IV.81: Operón del SSTI de *E. coli* responsable de la secreción de la hemolisina HlyA. Destacamos que TolC no se localiza en este operón. Los códigos proteicos indicados corresponden a la base de datos Uniprot. La barra de escala representa 1 Kb de tamaño.

Comenzamos el análisis comparativo empleando la proteína auxiliar HlyC (P06736) de *E. coli* como molde. La búsqueda de homólogos proteicos en el genoma de la cepa LD-07 mediante el uso de BlastP dio un resultado negativo. Debemos destacar que en otros SSTI esta proteína auxiliar también está ausente (Thomas *et al.*, 2014). Con respecto a la proteína de membrana interna HlyB (P08716), un total de 14 proteínas homólogas (A0J46_14895, A0J46_02790, A0J46_17350, A0J46_06990, A0J46_06995, A0J46_14825, A0J46_09135, A0J46_15515, A0J46_08440, A0J46_13000, A0J46_17575, A0J46_11170, A0J46_06900, y A0J46_07700) cuyos porcentajes de identidad oscilan entre 30-34%, se han localizado en el genoma de LD-07. Estas proteínas homólogas corresponden a transportadores de tipo ABC encargados del transporte de una amplia gama de sustratos (aminoácidos como metionina, glutamina o arginina, dipéptidos, hierro, etc). Las proteínas de membrana interna del SSTI forman parte de la familia de los transportadores ABC (Costa *et al.*, 2015), es por eso que muchos de los homólogos localizados en el genoma de LD-07 corresponden a este tipo de proteínas transportadoras. En lo relativo a la proteína de fusión de membrana HlyD (P06739), dos proteínas con similitudes bajas se hallaron en LD-07: i) la proteína A0J46_14870 (27% de identidad/89% de cobertura) anotada como proteína de fusión a membrana y componente de la familia PrtE/AprE; y ii) la proteína de fusión a membrana A0J46_10390 (22% de identidad/39% de cobertura), que curiosamente pertenece a un operón de genes junto con un transportador ABC. Para finalizar, en el genoma de LD-07 se localizó con una identidad y cobertura del 49% y 89%, respectivamente, una proteína TolC (A0J46_12840) homóloga a P02930, TolC de *E. coli*. Asimismo, la anotación del genoma de LD-07 mediante el servidor RAST no reveló la presencia de ningún Sistema de Secreción de tipo I.

4.8.4.2. Búsqueda del Sistema de Secreción tipo III

El Sistema de Secreción tipo III (SSTIII), es una máquina especializada en la transferencia en un solo paso, de sustratos denominados proteínas efectoras al citoplasma o a la membrana

plasmática de células eucariotas, gracias a la presencia de una estructura tipo aguja denominada inyectorio (Costa *et al.*, 2015; Green & Mecsas, 2016). Sirviéndonos del SSTIII descrito en el patógeno *Vibrio parahaemolyticus* (Fig. IV.82A), y más concretamente de alguno de los componentes estructurales considerados como esenciales del SSTIII de bacterias Gram negativas (Deng *et al.*, 2017) como moldes aminoacídicos, estudiamos la posible presencia de un SSTIII en el genoma de LD-07. Mediante el uso de BlastP, las proteínas homólogas localizadas son aquellas que pertenecen al aparato flagelar (datos no mostrados), hecho que evidencia su origen común (Diepold & Wagner, 2014; Deng *et al.*, 2017). Confirmando este resultado, la anotación del genoma de LD-07 realizada por RAST no clasificó ninguno de sus genes en el subsistema destinado a la agrupación de componentes proteicos del Sistema de Secreción tipo III.

Llegados a este punto, es necesario retomar información obtenida en la comparación de los genomas de *P. damselae* subsp. *damselae*, llevada a cabo en el capítulo 4.2 de Resultados y Discusión. La cepa tipo CIP 102761 presenta en su genoma un posible plásmido de gran tamaño al que denominamos pPHDD203 (Fig. IV.82B). Este vector codifica un SSTIII cuyos componentes proteicos son homólogos a los descritos en *V. parahaemolyticus* (Ono *et al.*, 2006). Estableciendo como objetivo el estudio de la presencia/ausencia del plásmido pPHDD203 en el cepario de *P. damselae* subsp. *damselae* disponible en el laboratorio, diseñamos cebadores para evaluar la presencia de tres genes ubicados en el mismo: *vscD* (VDA_000187) y *vcrV* (VDA_000193) del SSTIII, y VDA_000224, posible efector Aop. Los cebadores empleados fueron diseñados en base a la secuencia del pPHDD203 de la cepa tipo CIP 102761 (Tabla III.4 de Material y Métodos). La búsqueda mediante PCR de los tres genes citados dio resultados negativos para todas las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae* analizadas, excepto para CIP 102761 (Tabla IV.4). Este resultado indica que la presencia de un SSTIII constituye más la excepción que la norma en esta subespecie, dado que por el momento solo ha podido ser identificado en la cepa tipo.

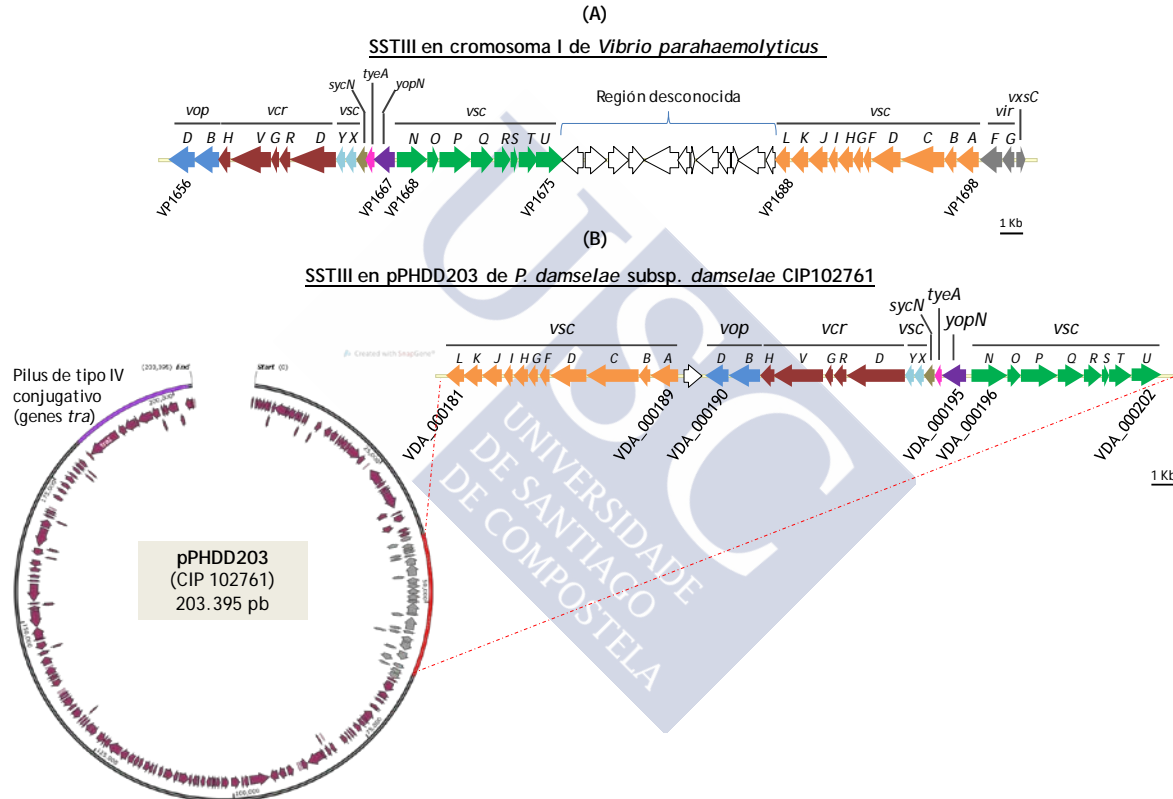


Fig. IV.82: (A) Representación del operón de genes del SSTIII de *Vibrio parahaemolyticus* descrito por Ono *et al.* (2006). (B) Representación del plásmido pPHDD203 de la cepa CIP 102761 de *P. damsela* subsp. *damsela*, codificante de un SSTIII, así como de un pilus de tipo IV conjugativo. La barra de escala representa 1 Kb de tamaño.

4.8.4.3. Búsqueda del Sistema de Secreción tipo IV: Pilus tipo IV y pilus tipo IV sensible a manosa

Si retomamos la información aportada en el apartado 4.8.1 del presente capítulo, recordaremos que en el genoma de LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* estaba presente el operón de biogénesis del pilus tipo IV *pilABCD* (Fig. IV.76A). El término pilus tipo IV (T4P) hace referencia a los apéndices extracelulares dinámicos presentes en muchas bacterias patógenas, en las que actúan como importantes factores de virulencia. Los componentes del aparato del pilus son similares a los del SSTII, pero la diferencia radica en que el sustrato de translocación del T4P son las subunidades de pilina que constituirán el filamento del pilus (Hospenthal *et al.*, 2017).

Tomando como referencia los operones constitutivos del pilus de tipo IV descrito en el patógeno de peces *V. anguillarum* (Frans *et al.*, 2013), llevamos a cabo una exploración *in silico* de proteínas homólogas en el genoma de LD-07. Los resultados aportados en la Fig. IV.83B nos revelan operones de homología estadísticamente significativa en dicho genoma. De este modo, y al igual que en *V. anguillarum*, el pilus tipo IV de *P. damsela* subsp. *damsela* se compone de los elementos proteicos codificados en los operones *pilABCD* (A0J46_18665-A0J46_18680), *pilMNOPQ* (A0J46_11705-A0J46_11725), *pilEfimTpilWV* (A0J46_10260-A0J46_10280), *pilUT* (A0J46_13525-A0J46_13530) y *pilF* (A0J46_00340) (Fig. IV.83A). Estos operones se localizan en diversas regiones del cromosoma I en la cepa LD-07 (Fig. IV.87), así como en el resto de genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* analizados: CIP 102761 (*PilABCD*: VDA_001191-VDA_001188; *PilMNOPQ*: VDA_003404-VDA_003407; *PilEfimTpilWV*: ; *PilUT*: VDA_001232-VDA_001231; *PilF*: VDA_002703); RM-71 (*PilABCD*: A0J47_12190-A0J47_12175; *PilMNOPQ*: A0J47_10325-A0J47_10305; *PilEfimTpilWV*: A0J47_07690-A0J47_07710; *PilUT*: A0J47_14835-A0J47_14830; *PilF*: A0J47_06740) y A-162 (*PilABCD*: A9D46_11165-A9D46_11180; *PilMNOPQ*: A9D46_05375-A9D46_05395; *PilEfimTpilWV*: A9D46_12050-A9D46_12030 ; *PilUT*: A9D46_13610- A9D46_13605 ; *PilF*: A9D46_01825).

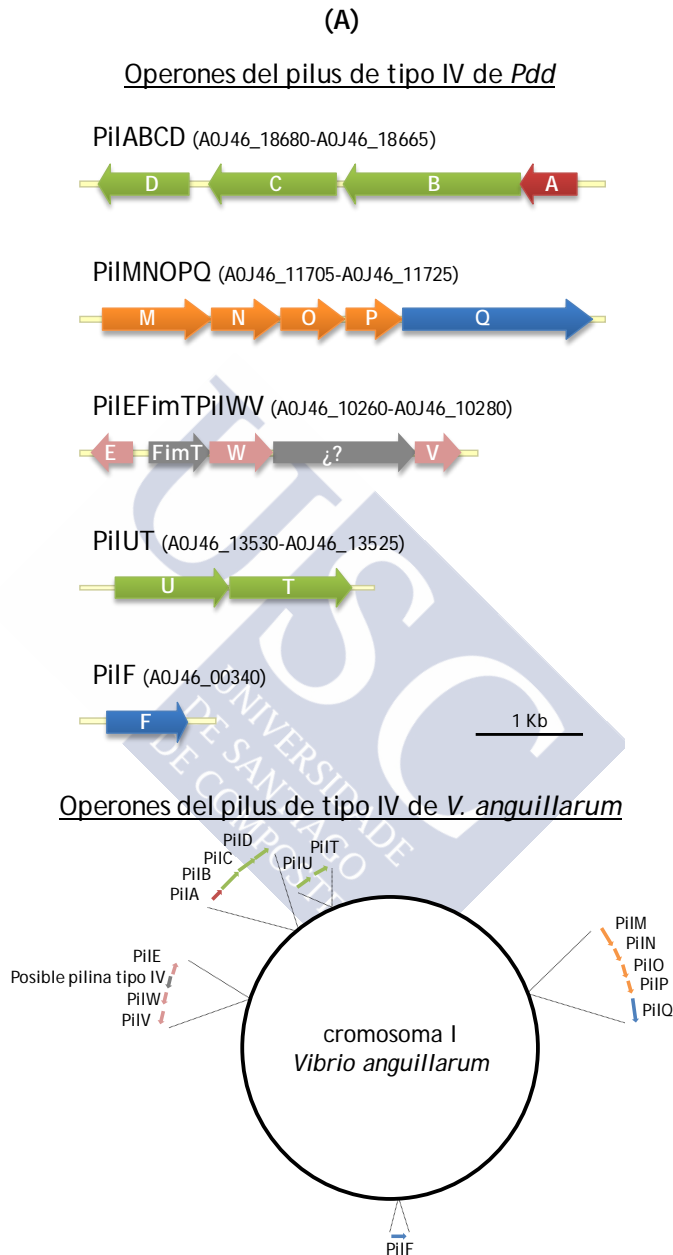


Fig. IV.83: (A) Organización genética de los operones de los pili de tipo IV en la cepa LD-07 de *P. damselae* subsp. *damselae* (*Pdd*) y en *V. anguillarum* (Frans *et al.*, 2013). La barra de escala representa 1 Kb de tamaño.

(B)

Pilus tipo IV de <i>V. anguillarum</i>			Pilus tipo IV de <i>Pdd</i>	
Código proteína	Nombre proteína	Función proteína	% id. /%cob.	Código proteína
Operón PiiABCD				
PL14_02410	PiiA	Prepilina principal	42%/93%	A0J46_18665
PL14_02405	PiiB	ATPasa citoplasmática	60%/100%	A0J46_18670
PL14_02400	PiiC	Plataforma de MI	55%/98%	A0J46_14075
PL14_02395	PiiD	Peptidasa y N-metiltransferasa de prepilinas	62%/100%	A0J46_14080
Operón PiiMNOQ				
PL14_12105	PiiM	Componente de unión entre citoplasma y ME	33%/98%	A0J46_11705
PL14_12100	PiiN	Componente de unión entre citoplasma y ME	34%/85%	A0J46_11710
PL14_12095	PiiO	Componente de unión entre citoplasma y ME	46%/97%	A0J46_11715
PL14_12090	PiiP	Componente de unión entre citoplasma y ME	38%/91%	A0J46_11720
PL14_12085	PiiQ	Secretina de ME	62%/95%	A0J46_11725
Operón PiiEFimTpiIWV				
PL14_03710	PiiE	Prepilina menor	46%/96%	A0J46_10260
PL14_03715	FimT	Posible prepilina	30%/84%	A0J46_10265
PL14_03720	PiiW	Prepilina menor	39%/96%	A0J46_10270
PL14_03725	-	Función desconocida	26%/93%	A0J46_10275
PL14_03730	PiiV	Prepilina menor	42%/97%	A0J46_10280
Operón PiiUT				
PL14_01945	PiiU	ATPasa citoplasmática	82%/96%	A0J46_13525
PL14_01950	PiiT	ATPasa citoplasmática	67%/97%	A0J46_13530
PiiF				
PL14_07670	PiiF	Lipoproteína de ME, interacción con secretina	51%/92%	A0J46_00340

(C)

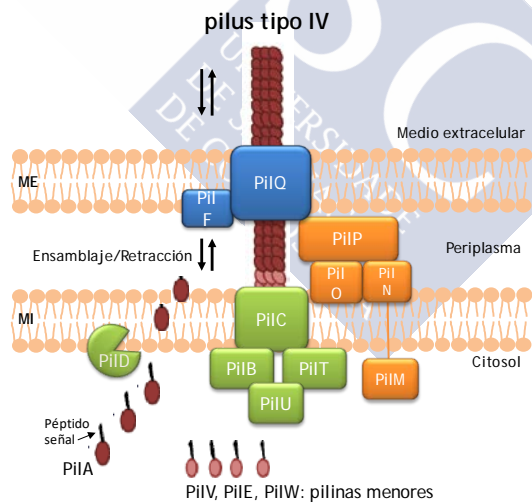


Fig. IV.83 (Cont.): (B) Análisis comparativo de los componentes proteicos del pilus tipo IV de *P. damselae* subsp. *damselae* (*Pdd*) en relación a *V. anguillarum* (%id.: porcentaje de identidad; %cob.: porcentaje de cobertura). (C) Representación esquemática del pilus tipo IV de *P. damselae* subsp. *damselae*, basado en el pilus tipo IV de *V. anguillarum* descrito por Frans *et al.* (2013).

Por otro lado, la secuenciación del genoma de LD-07 y su posterior anotación mediante el servidor RAST, nos reveló la presencia de dos operones de 16 genes descritos como pili-hemaglutinina sensible a manosa (msh): *mshIJKLMNEGF* (A0J46_14075-A0J46_14115) y *mshBACDOPQ* (A0J46_14120-A0J46_14150) (Fig. IV.84). Estos operones se muestran de manera contigua en el genoma de LD-07 (Fig. IV.87). Msh es un miembro de la familia del pilus tipo IV de gran importancia en *V. cholerae* dado que facilita la formación de biofilms y la supervivencia de la bacteria en ambientes acuáticos (Marsh & Taylor, 1999; Watnick *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2015). Comparando las secuencias aminoacídicas de los componentes de Msh en *V. cholerae* y *P. damsela* subsp. *damsela*, observamos un alto grado de conservación de los dos operones en ambas especies (Fig. IV.84B). Además, es necesario destacar que el operón Msh está presente en el cromosoma I de los cuatro genomas de *P. damsela* subsp. *damsela* comparados en el presente trabajo: CIP 102761 (VDA_003492- VDA_003503), RM-71 (A0J47_11760-A0J47_11835) y A-162 (A9D46_11595- A9D46_11520).

Asimismo, es interesante indicar que el plásmido pPHDD203, únicamente portado por la cepa tipo CIP 102761, codifica un pilus de tipo IV conjugativo (operón de genes *tra*) (Fig. IV.82B).

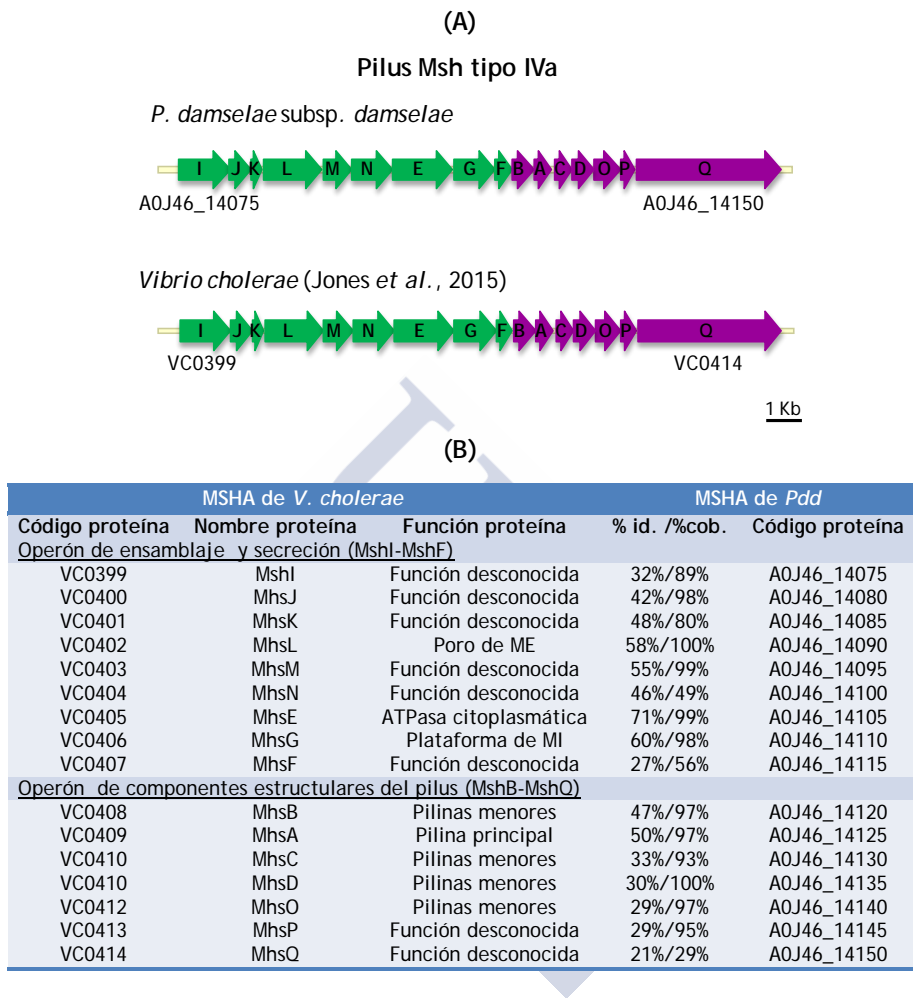


Fig. IV.84: (A) Representación esquemática de los operones Msh en la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela* (A0J46_14075-A0J46_14150) y *V. cholerae* (Jones et al., 2015). El operón codifica elementos necesarios para el ensamblaje y secreción (*mshI-mshF*), indicados en verde, y también los componentes estructurales del pilus (*mshB-mshQ*) en morado. La barra de escala representa 1 Kb de tamaño. (B) Tabla de homologías entre los operones Msh de *P. damsela* subsp. *damsela* (*Pdd*) y *V. cholerae* (%id.: porcentaje de identidad; %cob.: porcentaje de cobertura).

4.8.4.4. Búsqueda del Sistema de Secreción tipo V

El sistema de secreción de tipo V (SSTV) es una máquina macromolecular empleada por varias bacterias para secretar proteínas del espacio periplásmico al medio ambiente. Para ello, precisan de la intervención de la vía Sec para la translocación del sustrato al espacio periplásmico (Fan *et al.*, 2016). Los miembros de este sistema comparten un principio común que los distingue del resto de los sistemas de secreción: el poro de secreción (denominado dominio de translocación o dominio barril- β) generado a través de la membrana externa, es parte de la misma cadena polipeptídica de la proteína funcional (dominio pasajero o dominio- α) (Leo *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2016). Por lo tanto, el tipo de proteínas secretadas por esta vía son, en realidad, autotransportadoras. El SSTV se divide en un total de cinco clases, denominadas como tipos Va a Ve (Fig. IV.85A).

Tomando como referencia ejemplos de SSTV de diversas especies bacterianas, cuya estructura secundaria ha sido descrita en los últimos años, realizamos una búsqueda de proteínas homólogas en el genoma de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*. Los resultados expuestos en la Fig. IV.85B solo nos indican la existencia de la ORF A0J46_06080 homóloga a la fosfolipasa de tipo patatina PlpD del patógeno *Pseudomonas aeruginosa* (Salacha *et al.*, 2010). Las patatinas son un grupo de hidrolasas lipolíticas descubiertas en plantas, que parecen estar asociadas con la defensa contra parásitos (Strickland *et al.*, 1995). La búsqueda de dominios proteicos mediante Pfam de la ORF A0J46_06080, mostró la presencia del dominio típico de las fosfolipasas tipo patatina (código PF01734), así como un dominio POTRA (código PF07244). El dominio POTRA es el encargado de conectar el dominio pasajero con el dominio barril- β de translocación de los SSTV (Leo *et al.* 2012) (Fig. IV.85A). Esta fosfolipasa de tipo patatina también está localizada en los otros tres genomas de *P. damsela* estudiados (CIP 102761: VDA_001134; RM-71: A0J47_10005; y A-162: A9D46_07720). Salacha *et al.* (2010) sugieren que dada la presencia de homólogos a PlpD en bacterias patógenas y no patógenas, la implicación de las proteínas similares no se limita a la virulencia, sino que podría estar relacionada

con funciones tales como comunicación hospedador/simbionte-comensal o la intercelular.

Por otro lado, la anotación del genoma de LD-07 realizada por el servidor RAST, consideró la ORF A0J46_11030 como una adhesina autotransportadora. Las adhesinas autotransportadoras son proteínas superficiales multiméricas involucradas en diversos rasgos biológicos de bacterias gram negativas patógenas, incluida la adherencia, la formación de biofilms, la invasión, la supervivencia dentro de células eucariotas, la resistencia sérica y la citotoxicidad (Mil-Homens & Fialho, 2011; Leo *et al.*, 2012). La búsqueda de homólogos en otras especies dio como resultado su similitud con proteínas hipotéticas de diversas especies de *Photobacterium*, así como de adhesinas autotransportadoras de *V. vulnificus* (30% identidad; 40% cobertura). Posibles adhesinas autotransportadoras homólogas a A0J46_11030 también han sido localizadas en los genomas de las cepas CIP 102761 (VDA_000297), RM-71 (A0J47_16710) y A-162 (A9D46_04550). Sería interesante en el futuro estudiar en profundidad estos dos sistemas de secreción tipo V localizados en *P. damsela* subsp. *damsela*.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

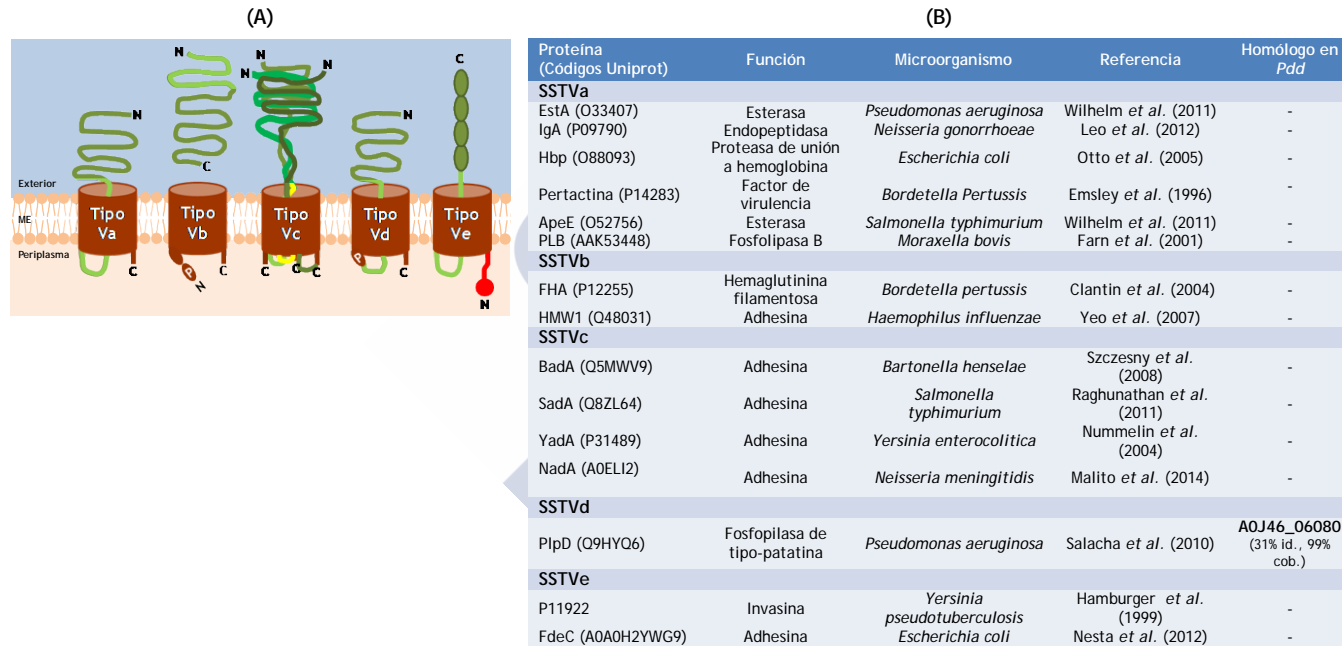


Fig. IV.85: (A) Modelos de topología de los diferentes sistemas de secreción de tipo V. El dominio de translocación se muestra en regiones marrones, la zona enlace entre dominios en verde claro o amarillo, el dominio pasajero en verde oscuro y el dominio periplásmico en rojo. Los dominios POTRA están etiquetados como (P). Imagen elaborada según la información aportada por Leo *et al.* (2012). (B) Ejemplos de diversos tipos de SSTV bacterianos, empleados como referencia en la búsqueda de proteínas homólogas en el genoma de *P. damselae* subsp. *damselae* (*Pdd*) LD-07 (%id.: porcentaje de identidad; %cob.: porcentaje de cobertura).

4.8.4.5. Búsqueda del Sistema de Secreción tipo VI

El Sistema de Secreción de tipo VI (SSTVI) es una maquinaria que transloca proteínas efectoras tóxicas en células eucariotas y/o procariotas, desempeñando un papel fundamental no solo para la supervivencia bacteriana en los ecosistemas ambientales, sino también en el contexto de la patogénesis y la competencia bacteriana (Ho *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015). Uno de los sistemas de secreción tipo VI mejor estudiados es el de *V. cholerae*. Los genes del SSTVI de *V. cholerae* se agrupan en un gran operón en el cromosoma II, conocido como operón principal, y en tres pequeños operones auxiliares (Joshi *et al.*, 2017) (Fig. IV.86A). Empleando como referencia las proteínas codificadas por los operones del SSTVI de *V. cholerae*, exploramos mediante el uso de BlastP, el genoma de la cepa LD-07 en busca de proteínas homólogas.

Tal y como podemos observar en la Fig. IV.86BC, *P. damsela* subsp. *damsela* presenta homólogos a la mayoría de los genes del operón principal de *V. cholerae*. Al igual que en el caso de *V. cholerae*, estos genes se agrupan en un solo operón principal, pero a diferencia del primero, se localiza en el cromosoma I (Fig. IV.87). Por el contrario, los operones auxiliares no son conservados, estando ausentes muchos de sus genes en el genoma de LD-07 (Fig. IV.86C). Cabe destacar que todas las proteínas del operón principal (A0J46_08175-A0J46_08245) del hipotético SSTVI hallado en LD-07, han sido clasificadas por el servidor RAST en la categoría de transporte de membrana, y concretamente en el subsistema Sistema de Secreción tipo VI. Debemos destacar que los genomas secuenciados en el presente trabajo también poseen en su cromosoma I el operón principal del SSTVI (cepa CIP 102761 (VDA_002157-VDA_002144), cepa RM-71 (A0J47_05140-A0J47_05065), cepa A-162 (A9D46_03560-A9D46_03635).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

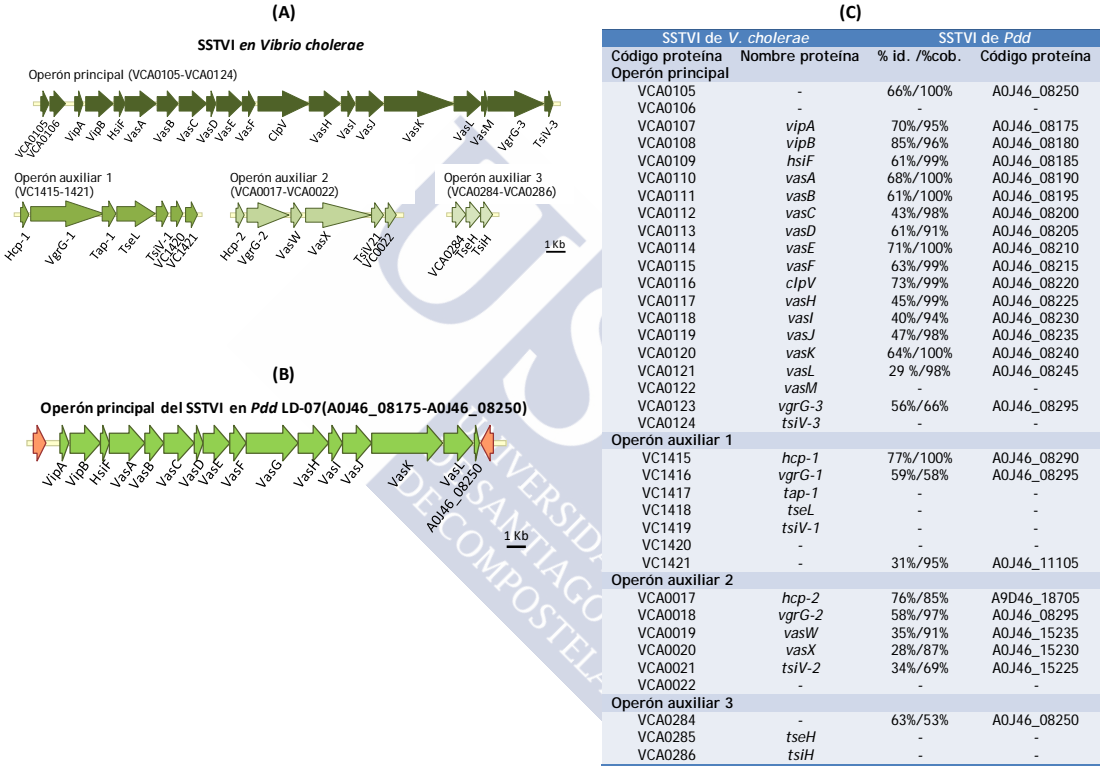


Fig. IV.86: (A) Representación de los operones de genes del SSTVI de *Vibrio cholerae*, descritos por Joshi *et al.* (2017). (B) Representación del operón principal del SSTVI predicho para la cepa LD-07 de *P. damselae* subsp. *damselae* (*Pdd*). Entre paréntesis se indican los códigos proteicos. La barra de escala representa 1 Kb de tamaño. (C) Búsqueda de proteínas homólogas al SSTVI de *V. cholerae* en el genoma de la cepa LD-07 de *P. damselae* subsp. *damselae* (%id.: porcentaje de identidad; %cob.: porcentaje de cobertura).

En resumen, tal y como podemos observar en la Fig. IV.87, la cepa LD-07 de *P. damselae* subsp. *damselae* presenta codificados a lo largo de sus cromosomas I y II, todos los componentes necesarios para la secreción dependiente de Sec y Tat, así como el SSTII, el pilus tipo IV, el pilus tipo IV dependiente de manosa (Msh), dos tipos de enzimas autotransportadoras (SSTV) y el SSTVI.



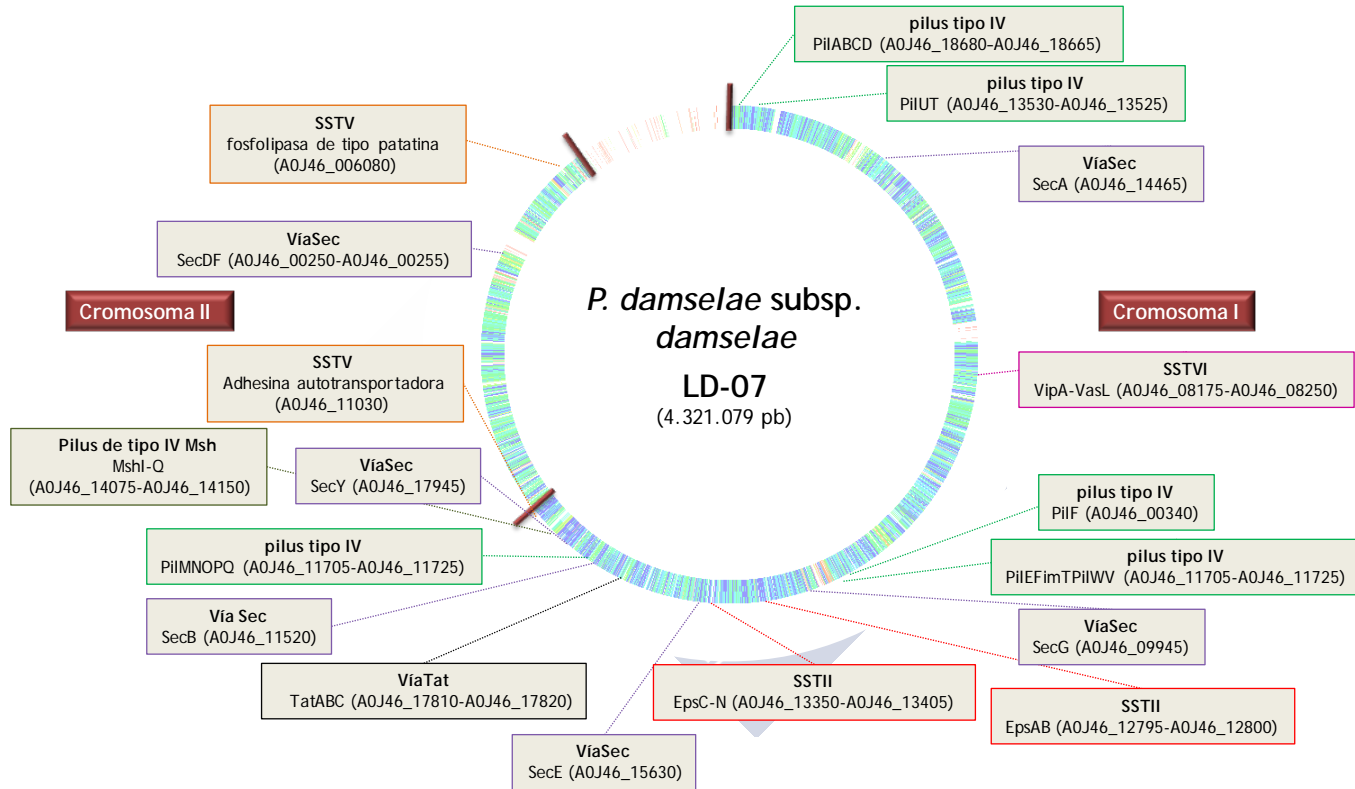


Fig. IV.87: Sistemas de secreción localizados en el genoma de la cepa LD-07 de *P. damsela* subsp. *damsela*.



CONCLUSIONS





5. CONCLUSIONS

The results obtained in this study provide new knowledge that will allow a better understanding of the genetic basis of pathogenicity exhibited by *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains lacking the virulence plasmid pPHDD1.

The specific conclusions drawn from this study are the following:

1. Strains of *P. damsela* subsp. *damsela* carrying pPHDD1 plasmid are more virulent for sea bass, and more cytotoxic for fish cell lines, than strains lacking the plasmid.
2. In general, the genomes of both types of *P. damsela* subsp. *damsela* strains (pPHDD1 carriers, and plasmidless strains) show a high degree of synteny in chromosomes I and II.
3. The pore-forming toxin PhlyC is a thermolabile toxin, secreted via the type II Secretion System (T2SS), and is the main responsible for the hemolytic phenotype produced by strains lacking pPHDD1 against sheep and rabbit erythrocytes.
4. PlpV is a thermolabile phospholipase secreted by the T2SS and is ubiquitous in *P. damsela* subsp. *damsela*. It is responsible for the hydrolysis of phospholipids in strains lacking pPHDD1. PlpV causes hemolysis of trout erythrocytes and, in presence of added lecithin, indirect hemolysis of sheep erythrocytes.
5. ColP is a thermolabile collagenase, partially secreted by the T2SS, and is responsible for the gelatinolytic activity exhibited by some strains of *P. damsela* subsp. *damsela*.

6. The lipolytic activity against tween 80 detected in the majority of *P. damsela* subsp. *damsela* strains is attributable to an enzyme that we here dubbed Lip80. Apparently, Lip80 is a lipoprotein with esterase activity, anchored to the outer membrane of the cell. The secretion mechanism of Lip80 is currently unknown.
7. *P. damsela* subsp. *damsela* has the ability to degrade tween 20 regardless of Lip80 production, suggesting the existence of another enzyme, probably an esterase, not yet identified.
8. PhlyC and PlpV contribute, apparently to the same extent, to virulence for sea bass. ColP, however, plays a minor role in virulence, and Lip80 does not interfere in virulence, at least under the conditions tested.
9. PhlyC and PlpV are responsible, in a synergistic fashion, for the cytotoxicity exhibited for fish and human cell lines by strains of *P. damsela* subsp. *damsela* lacking pPHDD1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aziz M., Eissa A. E., Hanna M. & Okada M. A. (2013).** Identifying some pathogenic *Vibrio/Photobacterium* species during mass mortalities of cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from some Egyptian coastal provinces. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **1**(2):87-95.
- Abfalter C. M., Schönauer E., Ponnuraj K., Huemer M., Gadermaier G., Regl C., et al. (2016).** Cloning, purification and characterization of the collagenase ColA expressed by *Bacillus cereus* ATCC 14579. *PLoS One* **11**(9):e0162433.
- Agari Y., Agari K., Sakamoto K., Kuramitsu S. & Shinkai A. (2011).** TetR-family transcriptional repressor *Thermus thermophilus* FadR controls fatty acid degradation. *Microbiology* **157**(Pt 6):1589-1601.
- Ahn S. K., Cuthbertson L. & Nodwell J. R. (2012).** Genome context as a predictive tool for identifying regulatory targets of the TetR family transcriptional regulators. *PLoS One* **7**(11):e50562.
- Aigbivbalu L. & Maraqa N. (2009).** *Photobacterium damsela* wound infection in a 14-year-old surfer. *South. Med. J.* **102**(4):425-426.
- Akoh C., Lee C., Liaw C., Huang H. & Shaw F. (2004).** GDSL family of serine esterase/lipase. *Prog. Lipid. Res.* **43**(6):534-552.
- Alberti-Segui C., Goeden K. R. & Higgins D. E. (2007).** Differential function of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell-to-cell spread. *Cell. Microbiol.* **9**(1):179-195.
- Alday V. (2010).** El seguro de acuicultura. La necesidad de evaluación del riesgo de enfermedades para la sostenibilidad de una compañía. *Trébol* **53**:4-13.

- Alvarez J. R., Lamba S., Dyer K. Y. & Apuzzio J. J. (2006).** An unusual case of urinary tract infection in a pregnant woman with *Photobacterium damsela*. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2006**:80682.
- Anand S., Singh V., Singh A. K., Mittal M., Datt M., Subramani B. & Kumaran S. (2012).** Equilibrium binding and kinetic characterization of putative tetracycline repressor family transcription regulator Fad35R from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J.* **279**(17):3214-3228.
- Andreeva A., Howorth D., Chothia C., Kulesha E. & Murzin A. (2014).** SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining. *Nucleic Acids Res.* **42**(D1):D310-D314. <http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk/>
- APROMAR (2017).** La acuicultura en España (2017). Informe realizado por la Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR): www.apromar.es. Todas las imágenes procedentes de este informe cuentan con el permiso de la Asociación Empresarial de Acuicultura de España para su difusión.
- Arpigny J. L. & Jaeger K. E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343**(1):177-183.
- Asato J. & Kanaya F. (2004).** Fatal infection of the hand due to *Photobacterium damsela*: A case report. *Clin. Infect. Dis.* **38**(10):100-101.
- Austin B. (2010).** Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol.* **140**(3-4):310-317.
- Awada M. M., Ellemorb D. M., Bryantc A. E., Matsushita O., Boyd R. L., Stevens D. L., et al. (2000).** Construction and virulence testing of a collagenase mutant of *Clostridium perfringens*. *Microb. Pathog.* **28**(2):107-117.
- Ayers M., Howell P. L. & Burrows L. L. (2010).** Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries. *Future Microbiol.* **5**(8):1203-1218.
- Badakov R. & Jaźwińska A. (2006).** Efficient transfection of primary zebrafish fibroblasts by nucleofection. *Cytotechnology* **51**(2):105-110.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai F., Sun B., Woo N. Y. & Zhang X. H. (2010).** *Vibrio harveyi* hemolysin induces ultrastructural changes and apoptosis in flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**(1):70-75.
- Bakopoulos V., Pearson M., Volpatti D., Gousmani L., Adams A., Galeotti M., et al. (2003).** Investigation of media formulations promoting differential antigen expression by *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and recognition by sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), immune sera. *J. Fish Dis.* **26**(1):1-13.
- Balado M., Puentes B., Couceiro L., Fuentes-Monteverde J. C., Rodríguez J., Osorio C. R., et al. (2017a).** Secreted citrate serves as iron carrier for the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**:361.
- Balado M., Benzekri H., Labella A. M., Claros M. G., Manchado M., Borrego J. J., et al. (2017b).** Genomic analysis of the marine fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Insertion sequences proliferation is associated with chromosomal reorganisations and rampant gene decay. *Infect. Genet. Evol.* **54**:221-229.
- Ball A. S., Chaparian R. R. & van Kessel J. C. (2017).** Quorum sensing gene regulation by LuxR/HapR master regulators in vibrios. *J. Bacteriol.* **199**(19):e00105-17.
- Banerji S. & Flieger A. (2004).** Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria?. *Microbiology* **150**(Pt 3):522-525.
- Barber G. R. & Swygert J. S. (2000).** Necrotizing fasciitis due to *Photobacterium damsela* in a man lashed by a stingray. *N. Engl. J. Med.* **342**(11):824-824.
- Bassegoda A., Pastor F. I. & Diaz P. (2012).** *Rhodococcus* sp. strain CR-53 LipR, the first member of a new bacterial lipase family (family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* lipase clan. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(6):1724-1732.
- Bayer S., Kunert A., Ballschmiter M. & Greiner-Stoeffele T. (2010).** Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization

- of two esterases from a metagenomic library. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **18**(3):181-187.
- Beckwith J. (2013).** The Sec-dependent pathway. *Res. Microbiol.* **164**(6):497-504.
- Beecher D. J. & Wong A. C. (2000).** Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology* **146**(12):3033-3039.
- Bender J. & Flieger A. (2010).** Lipases as pathogenicity factors of bacterial pathogens of humans. Timmis K. N. (Ed.), *Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids and Derived Compounds* (pp. 3241-3258). Berlín: Springer.
- Bendtsen J. D., Kierner L., Fausbøll A. & Brunak S. (2005).** Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* **5**:58. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>
- Bhakdi S. & Tranum-Jensen J. (1986).** Membrane damage by pore-forming bacterial cytolysins. *Microb. Pathog.* **1**(1):5-14.
- Bhardwaj K., Raju A. & Rajasekharan R. (2001).** Identification, purification and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiol.* **127**(4):1728-1738.
- Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., et al. (1997).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331):1453-1462.
- Bleves S., Viarre V., Salacha R., Michel G. P., Filloux A. & Voulhoux R. (2010).** Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**(8):534-543.
- Bond M. D. & Wart H. E. V. (1984).** Purification and separation of individual collagenases from *Clostridium histolyticum* using red dye ligand chromatography. *Biochemistry (US)*. **23**(13):3077-3085.

- Bornscheuer U. T. (2002).** Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysts. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**(1):73-81.
- Borrelli G. M. & Trono D. (2015).** Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int. J. Mol. Sci.* **16**(9):20774-20840.
- Botella S., Pujalte M. J., Macian M. C., Ferrus M. A., Hernandez J. & Garay E. (2002).** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *J. Appl. Microbiol.* **93**(4):681-688.
- Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A. & Fusenig N. E. (1988).** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* **106**(3):761-771.
- Bouزيد M., Hunter P. R., Chalmers R. M. & Tyler M. (2013).** *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**(1):115-134.
- Boyd E. F., Carpenter M. R., Chowdhury N., Cohen A. L., Haines-Menges B. L., Kalburge S. S., et al. (2015).** Post-genomic analysis of members of the family *Vibrionaceae*. *Microbiol. Spectrum* **3**(5):VE-0009-2014.
- Blum G., Ott M., Lischewski A., Ritter A., Imrich H., Tschape H., et al. (1994).** Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* **62**(2):606-614.
- Bradford M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Bruggemann H., Henne A., Hoster F., Liesegang H., Wiezer A., Strittmatter A., et al. (2004).** The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science* **305**(5684):671-673.

- Bryant A. E., Bayer C. R., Hayes-Schroer S. M. & Stevens D. L. (2003).** Activation of platelet gpIIb/IIIa by phospholipase C from *Clostridium perfringens* involves store-operated calcium entry. *J. Infect. Dis.* **187**(3):408-417.
- Buck J. D. (1990).** Potentially pathogenic marine *Vibrio* species in seawater and marine animals in the Sarasota, Florida, area. *J. Coastal Res.* **6**(4):943-948.
- Buck J. D., Overstrom N. A., Patton G. W., Anderson H. F. & Gorzelany J. F. (1991).** Bacteria associated with stranded cetaceans from the Northeast USA and Southwest Florida Gulf coasts. *Dis. Aquat. Org.* **10**(2):147-152.
- Buck J. D., Wells R. S., Rhinehart H. L. & Hansen L. J. (2006).** Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean waters. *J. Wildl. Dis.* **42**(3):536-544.
- Camilli A., Tilney L. G. & Portnoy D. A. (1993).** Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **8**(1):143-157.
- Campos M., Cisneros D. A., Nivaskumar M. & Francetic O. (2013).** The type II secretion system - a dynamic fiber assembly nanomachine. *Res. Microbiol.* **164**(6):545-555.
- Carr P. D. & Ollis D. L. (2009).** Alpha/beta hydrolase fold: an update. *Protein Pept. Lett.* **16**(10):1137-1148.
- Carriere F., Thirstrup K., Hjorth S. & Boel E. (1994).** Cloning of the classical guinea pig pancreatic lipase and comparison with the lipase related protein 2. *FEBS Lett.* **388**(1):63-68.
- Casadevall A. & Pirofski L. (2001).** Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* **184**(3):337-344.
- Casalone C., Mazzariol S., Pautasso A., Guardo G.D., Nocera F.D., Lucifora G., et al. (2014).** Cetacean strandings in Italy: An unusual mortality event along the Tyrrhenian Sea coast in 2013. *Dis. Aquat. Organ.* **109**(1):81-86.

- Cascales E., Buchanan S. K., Duche D., Kleanthous C., Lloubès R., Postle K., *et al.* (2007). Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**(1):158-229.
- Cassat J. E. & Skaar E. P. (2013). Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* **13**(5):509-519.
- Castañón-Sánchez C. A., Enríquez-Rincón F. & Figueroa-Arredondo P. (2015). Efecto citotóxico de la proteína VCC de *Vibrio cholerae* en células HEK-293. *Evid. Med. Invest. Salud* **8**(3):111-116.
- Castro B. M., Prieto M. & Silva L. C. (2014). Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Prog. Lipid. Res.* **54**:53-67.
- Chatzi K. E., Sardis M. F., Karamanou S. & Economou A. (2013). Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *Biochem. J.* **449**(1):25-37.
- Chen C. H., Cheng J. C., Cho Y. C. & Hsu W. H. (2005). A gene cluster for the fatty acid catabolism from *Pseudonocardia autotrophica* BCRC12444. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**(3):863-868.
- Chimetto L. A., Cleenwerck I., Thompson C. C., Brocchi M., Willems A., De Vos P. & Thompson F. L. (2010). *Photobacterium jeanii* sp. nov., isolated from corals and zoanthids. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**(Pt 12):2843-2848.
- Chiu T. H., Kao L. Y. & Chen M. L. (2013). Antibiotic resistance and molecular typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, isolated from seafood. *J. Appl. Microbiol.* **114**(4):1184-1192.
- Chuang Y. C., Chiou S. F., Su J. H., Wu M. L. & Chang M. C. (1997). Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. *Microbiology* **143**(Pt 3):803-812.
- Cianciotto N. P. (2013). Type II secretion and *Legionella* virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **376**:81-102.
- Cianciotto N. P. & White R. C. (2017). Expanding role of type II secretion in bacterial pathogenesis and beyond. *Infect. Immun.* **285**(5):e00014-17.

- Clantin B., Hodak H., Willery E., Loch C., Jacob-Dubuisson F. & Villeret V. (2004).** The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(16):6194-6199.
- Clarridge J. E. & Zighelboim-Daum S. (1985).** Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound infection. *J. Clin. Microbiol.* **21**(3):302-306.
- Coffey J. A., Harris R. L., Rutledge M. L., Bradshaw M. W. & Williams T. W. (1986).** *Vibrio damsela*: another potentially virulent marine vibrio. *J. Infect. Dis.* **153**(4):800-802.
- Company R., Sitja-Bobadilla A., Pujalte M. J., Garay E., Álvarez-Pellitero P. & Pérez-Sánchez J. (1999).** Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *J. Fish Dis.* **22**(4):299-309.
- Cornelis P. & Andrews S. C. (eds) (2010).** *Iron uptake and homeostasis in microorganisms*. Norfolk, UK: Caister Academic Press (Horizon Press).
- Costa T. R., Felisberto-Rodrigues C., Meir A., Prevost M. S., Redzej A., Trokter M., et al. (2015).** Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**(6):343-359.
- Cowles C. E., Li Y., Semmelhack M. F., Cristea I. M. & Silhavy T. J. (2011).** The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **79**(5):1168-1181.
- Cristobal S., de Gier J. W., Nielsen H. & von Heijne G. (1999).** Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**(11):2982-2990.
- Cuthbertson L. & Nodwell J. R. (2013).** The TetR family of regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**(3):440-475.
- Cutter D. L. & Kreger A. S. (1990).** Cloning and expression of the damselysin gene from *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* **58**(1):266-268.
- Dal Peraro M. & van der Goot F. G. (2016).** Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**(2):77-92.

- Daniel L. W., King L. & Kennedy M. (1988).** Phospholipase activity of bacterial toxins. *Methods Enzymol.* **165**:298-301.
- Darling A. E., Mau B. & Perna N. T. (2010).** ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* **5**(6):e11147.
- David V. A., Deutch A. H., Sloma A., Pawlyk D., Aly A. & Durham D. R. (1992).** Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease, vibriolysin, of *Vibrio proteolyticus*. *Gene* **112**(1):107-112.
- Davis B. R., Fanning G. R., Madden J. M., Steigerwalt A. G., Bradford H. B., Smith H. L., et al. (1981).** Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.* **14**(6):631-639.
- De S. & Olson R. (2011).** Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin heptamer reveals common features among disparate pore-forming toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**:7385-7390.
- De Ley J., Mannheim W., Mutters R., Piechulla K., Tytgat R., Segers P., et al. (1990).** Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**(2):126-137.
- Deng W., Marshall N. C., Rowland J. L., McCoy J. M., Worrall L. J., Santos A. S., et al. (2017).** Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**(6):323-337.
- Derewenda Z. & Derewenda U. (1991).** Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem. Cell Biol.* **69**(12):842-851.
- Diepold A. & Wagner S. (2014).** Assembly of the bacterial type III secretion machinery. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**(4):802-822.
- Dorrell N., Martino M. C., Stabler R. A., Ward S. J., Zhang Z. W., McColm A. A., et al. (1999).** Characterization of *Helicobacter pylori* PldA, a phospholipase with a role in colonization of the gastric mucosa. *Gastroenterology* **117**(5):1098-1104.

- Douzi B., Filloux A. & Voulhoux R. (2012).** On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**(1592):1059-1072.
- Dryden M., Legarde M., Gottlieb T., Brady L. & Ghosh H. K. (1989).** *Vibrio damsela* wound infections in Australia. *Med. J. Aust.* **151**(9):540-541.
- Duarte A. S., Correia A. & Esteves A. C. (2014).** Bacterial collagenases - A review. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**(1):106-126.
- Durand E., Verger D., Rêgo A. T., Chandran V., Meng G., Fronzes R., et al. (2009).** Structural biology of bacterial secretion systems in gram-negative pathogens--potential for new drug targets. *Infect. Disord. Drug Targets.* **9**(5):518-547.
- Eckhard U., Schonauer E., Ducka P., Briza P., Nüss D. & Brandstetter H. (2009).** Biochemical characterization of the catalytic domains of three different clostridial collagenases. *Biol. Chem.* **390**(1):11-18.
- Eckhard U., Schoenauer E., Nuess D. & Brandstetter H. (2011).** Structure of Collagenase G Reveals a Chew- and -Digest Mechanism of Bacterial Collagenolysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**(10):1109-1114.
- Eckhard U., Schönauer E. & Brandstetter H. (2013).** Structural basis for activity regulation and substrate preference of clostridial collagenases G, H, and T. *J. Biol. Chem.* **288**(28):20184-20194.
- Eckhard U., Huesgen P. F., Brandstetter H. & Overalla C. M. (2014).** Proteomic protease specificity profiling of clostridial collagenases reveals their intrinsic nature as dedicated degraders of collagen. *J. Proteomics* **100**(100):102-114.
- Ehrlich P. & Shiga K. (1904).** Farbentherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. *Berlin Klin. Wochenschrift* **20**:329-362.
- Ekwall B. (1983).** Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **407**:64-77.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ellermann M. & Arthur J. C. (2017).** Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. *Free Radic. Biol. Med.* **105**:68-78.
- Emsley P., Charles I. G., Fairweather N. F. & Isaacs N. W. (1996).** Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* **381**(6577):90-92.
- Ewis H. E., Abdelal A. T. & Lu C. D. (2004).** Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene* **329**:187-195.
- Exton J. H. (1990).** Signalling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* **265**(1):1-4.
- Fan E., Chauhan N., Udatha D. B., Leo J. C. & Linke D. (2016).** Type V secretion systems in bacteria. *Microbiol. Spectr.* **4**(1):VMBF-0009-2015.
- FAO (2016).** The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2016. Departamento de Pesca. Roma. 2016.
- Farn J. L., Strugnell R. A., Hoyne P. A., Michalski W. P. & Tennent J. M. (2001).** Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. *J. Bacteriol.* **183**(22):6717-6720.
- Fath M. J. & Kolter R. (1993).** ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**(4):995-1017.
- Figueroa-Arredondo P., Heuser J. E., Akopyants N. S., Morisaki J. H., Giono-Cerezo S., Enríquez-Rincón F. et al. (2001).** Cell vacuolation caused by *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infect. Immun.* **69**(3):1613-1624.
- Fijan N., Sulnamovic D., Bearzotti M., Muzinic D., Zwillenberg L. O., Chilmonczyk S., et al. (1983).** Some properties of the Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* **134**(2):207-220.
- Filippova E. V., Wawrzak Z., Kiryukhina O., Endres M., Joachimiak J. & Anderson W. F. (2006).** Midwest Center for Structural Genomics

(MCSG). Crystal structure of the hypothetical protein from *Ruminiclostridium thermocellum* ATCC 27405. To be published.

Finn R.D., Coghill P., Eberhardt R. Y., Eddy S. R., Mistry J., Mitchell A. L., et al. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* **44**(D1):D279-D285. <http://pfam.xfam.org/>

Fiore A. E., Michalski J. M., Russell R. G., Sears C. L. & Kaper J. B. (1997). Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (Lecithinase) produced by *Vibrio cholera*. *Infect. Immun.* **65**(8):3112-3117.

Flieger A., Neumeister B., & Cianciotto N. P. (2002). Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. *Infect. Immun.* **70**(11):6094-6106.

Flores-Díaz M., Monturiol-Gross L., Naylor C., Alape-Giron A. & Flieger A. (2016). Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**(3):597-628.

Fojan P., Johnson P. H., Petersen T. N. & Petersen S. B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie.* **82**(11):1033-1041.

Fouz B., Larsen J. L. & Toranzo A. E. (1991). *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortalities in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **11**(2):80-81.

Fouz B., Larsen J. L., Nielsen B., Barja J. L. & Toranzo A. E. (1992). Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Dis. Aquat. Org.* **12**:155-166.

Fouz B., Barja J. L., Amaro C., Rivas C. & Toranzo A. E. (1993). Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Curr. Microbiol.* **27**(6):341-347.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fouz B., Toranzo A.E., Biosca E.G., Mazoy R. & Amaro C. (1994).** Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**(2):181-188.
- Fouz B., Novoa B., Toranzo A. E. & Figueras A. (1995).** Histopathological lesions caused by *Vibrio damsela* in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L) - inoculations with live cells and extracellular products. *J. Fish Dis.* **18**(4):357-364.
- Fouz B., Biosca E. G. & Amaro C. (1997).** High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin. *J. Appl. Microbiol.* **82**(2):157-167.
- Fouz B., Toranzo A. E., Marco-Noales E. & Amaro C. (1998).** Survival of fish-virulent strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in seawater under starvation conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **168**(2):181-186.
- Fouz B., Toranzo A. E., Milan M. & Amaro C. (2000).** Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *J. Appl. Microbiol.* **88**(3):531-535.
- Frans I., Busschaert P., Dierckens K., Michiels C. W., Willems K. A., Lievens B., et al. (2013).** Are type IV pili involved in *Vibrio anguillarum* virulence towards sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae?. *Agricultural Sciences* **4**(6A):30-38.
- Fraser S. L., Purcell B. K., Delagdo B., Baker A. E. & Whelen A. C. (1997).** Rapidly fatal infection due to *Photobacterium (Vibrio) damsela*. *Clin. Infect. Dis.* **25**(4):935-936.
- Frees D., Brondsted L. & Ingmer H. (2013).** Bacterial proteases and virulence. *Subcell. Biochem.* **66**:161-192.
- Feng Y. & Cronan J. E. (2011).** Complex binding of the FabR repressor of bacterial unsaturated fatty acid biosynthesis to its cognate promoters. *Mol. Microbiol.* **80**(1):195-218.
- Fu J., Leiros H. K., de Pascale D., Johnson K. A., Blencke H. M. & Landfald B. (2013).** Functional and structural studies of a novel cold-

adapted esterase from an Arctic intertidal metagenomic library. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**(9):3965-3978.

Fujioka R. S., Greco S. B., Cates M. B. & Schroeder J. P. (1988). *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Dis. Aquat. Org.* **4**:1-8.

Ganz T. & Nemeth E. (2015). Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**(8):500-510.

García Cortés V. & Antillon F. (1990). Isolation of enteropathogenic *Vibrio* in bivalves and mud from the Nicoya gulf, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **38**(2B):437-440.

García-Rosado E., Cano I., Martín-Antonio B., Labella A., Manchado M., Alonso M. C., et al. (2007). Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *Int. Microbiol.* **10**(3):193-199.

Gauthier G., Lafay B., Ruimy R., Breittmayer V., Nicolas J. L., Gauthier M., et al. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**(1):139-144.

Ghinsberg R. C., Drasinover V., Sheinberg Y. & Nitzan Y. (1995). Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio* species in Mediterranean coastal water and beaches: a possible health hazard. *Biomed. Lett.* **51**:151-159.

Giovannoni S. J., Cameron Thrash J. & Temperton B. (2014). Implications of streamlining theory for microbial ecology. *ISME J.* **8**(8):1-13.

Gomez-Gil B., Roque A., Rotllant G., Peinado L., Romalde J. L., Doce A., et al. (2011). *Photobacterium swingsii* sp. nov., isolated from marine organisms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**(Pt 2):315-319.

- Gomez-Gil B., Roque A., Rotllant G., Romalde J. L., Doce A., Eggermont M., et al. (2016).** *Photobacterium sanguinancreri* sp. nov. isolated from marine animals. *Antonie Van Leeuwenhoek* **109**(6):817-825.
- Gonzalez M. R., Bischoffberger M., Pernot L., van der Goot F. G. & Freche B. (2008).** Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story?. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**(3):493-507.
- Goodell K. H., Jordan M. R., Graham R., Cassidy C. & Nasraway S. A. (2004).** Rapidly advancing necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium (Vibrio) damsela*: a hyperaggressive variant. *Crit. Care Med.* **32**(1):278-281.
- Gouaux E. (1998).** Roll out the barrel. *Nat. Struct. Biol.* **5**(11):931-932.
- Granata F., Balestrieri B., Petraroli A., Giannattasio G., Marone G. & Triggiani M. (2003).** Secretory phospholipase A2 as multivalent mediators of inflammatory and allergic disorders. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **131**(3):153-163.
- Green E. R. & Mecsas J. (2016).** Bacterial secretion systems – An overview. *Microbiol. Spectrum* **4**(1):VMBF-0012-2015.
- Grimes D. J., Colwell R. R., Stemmler J., Hada H., Maneval D., Hetrick F. M., et al. (1984a).** *Vibrio* species as agents of elasmobranch disease. *Helgol. Meeresunters* **37**(1-4):309-315.
- Grimes D. J., Stemmler J., Hada H., May E. B., Maneval D., Hetrick F. M., et al. (1984b).** *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microb. Ecol.* **10**(3):271-282.
- Grimes D. J., Brayton P., Colwell R. R. & Gruber H. (1985).** *Vibrios* as autochthonous flora of neritic sharks. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**(2):221-226.
- Gutiérrez L. L. R., Hamdan A., Bustos M. J. & Sainz T. (2014).** Sistemas de secreción en bacterias. Nájera Media O., Mandujano Valdés M., Salinas Urbina A. A., Martínez Alcántara S., Lara Flores N. & Castillejos Salazar M. (Eds.), *Tópicos de Ciencias Básicas en Salud* (pp. 71-85). Méjico: Universidad Autónoma Metropolitana.

- Hall T. A. (1999).** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Oxford University Press. **41**:95-98.
- Hamburger Z. A., Brown M. S., Isberg R. R. & Bjorkman P. J. (1999).** Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**(5438):291-295.
- Hamon M. A., Ribet D., Stavru F. & Cossart P. (2012).** Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. *Trends Microbiol.* **20**(8):360-368.
- Han J. H., Lee J. H., Choi Y. H., Park J. H., Choi T. J. & Kong I. S. (2002).** Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. *Biochim. Biophys. Acta* **1599**(1-2):106-114.
- Handrick R., Reinhardt S., Focarete M. L., Scandola M., Adamus G., Kowalczyk M., et al. (2001).** A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acid. *J. Biol. Chem.* **276**(32):36215-36224.
- Hanley K., Komuves L.G., Ng D.C., Schoonjans K., He S.S., Lau P., et al. (2000).** Farnesol stimulates differentiation in epidermal keratinocytes via PPARalpha. *J. Biol. Chem.* **275**(15):11484-11491.
- Hanlon R. T., Forsythe J. W., Cooper K. M., Dinuzzo A. R., Folse D. S. & Kelly M. T. (1984).** Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses. *J. Invertebr. Pathol.* **44**(1):67-83.
- Harrington D. J. (1996).** Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect. Immun.* **64**(6):1885-1891.
- Harrison P. W., Lower R. P., Kim N. K. & Young J. P. (2010).** Introducing the bacterial "chromid": not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* **18**(4):141-148.
- Hasan F., Shah A. A. & Hameed A. (2006).** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39**(2):235-251.

- Hassanzadeh Y., Bahador N. & Baseri-Salehi M. (2015).** First time isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from *Caranx sexfasciatus* in Persian Gulf, Iran. *Iran. J. Microbiol.* **7**(3):178-184.
- Haugwitz U., Bobkiewicz W., Han S. R., Beckmann E., Veerachato G., Shaid S., et al. (2006).** Pore-forming *Staphylococcus aureus* alpha-toxin triggers epidermal growth factor receptor-dependent proliferation. *Cell. Microbiol.* **8**(10):1591-1600.
- Hausmann S. & Jaeger K. E. (2010).** Lipolytic enzymes from bacteria. In: Timmis KN, editor. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin Heidelberg: Springer; 2010. pp. 1099-1126.
- Heidelberg J. F., Eisen J. A., Nelson W. C., Clayton R. A., Gwinn M. L., Dodson R. J., et al. (2000).** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**(6795):477-483.
- Hemilä H., Koivula T. T. & Palva I. (1994).** Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: identification of a superfamily of esterases and lipases. *Biochim. Biophys. Acta* **1210**(2):249-253.
- Henderson R. (1970).** Structure of crystalline α -chymotrypsin: IV. The structure of indoleacryloyl- α -chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. *J. Mol. Biol.* **54**(2):341-354.
- Herrero M., de Lorenzo V. & Timmis K. N. (1990).** Transposon vectors containing nonantibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**(11):6557-6567.
- Hinnebusch B. J., Rudolph A. E., Cherepanov P., Dixon J. E., Schwan T. G. & Forsberg A. (2002).** Role of yersinia murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* **296**(5568):733-735.
- Hipler B. (2007).** The use of an ATP bioluminescence assay to quantify cell cytotoxicity. BMG LABTECH, Germany.
- Hirono I., Masuda T. & Aoki T. (1996).** Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.* **21**(3):173-182.

- Ho B. T., Dong T. G. & Mekalanos J. J. (2014).** A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe* **15**(1):9-21.
- Hoa T. T. T., Oanh D. T. H. & Phuong N. T. (2000).** Characterization and pathogenicity of *Vibrio* bacteria isolated from freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Hatcheries: Part 1: Isolation and identification of *Vibrio* spp. from larval stages.
- Hobbs M. & Mattick J. S. (1993).** Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* **10**(2):233-243.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. & Williams S. T. (1994).** *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th edition. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Honda T. & Finkelstein R. A. (1979).** Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. *Infect. Immun.* **26**(3):1020-1027.
- Hooper N. M. (1994).** Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**(1):1-6.
- Horton R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K. & Pease L. R. (1989).** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**(1):61-68.
- Hospenthal M. K., Costa T. R. D. & Waksman G. (2017).** A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**(6):365-379.
- Hou Y. M. (1999).** Transfer RNAs and pathogenicity islands. *Trends Biochem. Sci.* **24**(8):295-298.
- Hsu P. Y., Lee K. K., Lee P. S., Hu C. C., Lin C. H. & Liu P. C. (2013).** Biochemical characterization of a phospholipase A2 from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Z. Naturforsch. C.* **68**(11-12):471-481.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hubbard T. J., Ailey B., Brenner S. E., Murzin A. G. & Chothia C. (1999).** "SCOP: A structural classification of proteins database". *Nucleic Acids Res.* **27**(1):254-256. <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>
- Humble M. W., King A. & Phillips I. (1977).** API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J. Clin. Pathol.* **30**(3):275-277.
- Hundenborn J., Thurig S., Kommerell M., Haag H. & Nolte O. (2013).** Severe wound infection with *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* and *Vibrio harveyi*, following a laceration injury in marine environment: A case report and review of the literature. *Case Rep. Med.* **2013**:610632.
- Hwang W., Lee N. Y., Kim J., Lee M. A., Kim K. S., Lee K. H., et al. (2011).** Functional characterization of EpsC, a component of the type II secretion system, in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **79**(10):4068-4080.
- Iacovache I., van der Goot F. G. & Pernot L. (2008).** Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**(7-8):1611-1623.
- Istivan T. S. & Coloe P. J. (2006).** Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology* **152**(Pt 2):1263-1274.
- Ivanov I. T. (2007).** Allometric dependence of the life span of mammal erythrocytes on thermal stability and sphingomyelin content of plasma membranes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **147**(4):876-884.
- Jacobs A. C., Hood I., Boyd K. L., Olson P. D., Morrison J. M., Carson S., et al. (2010).** Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect. Immun.* **78**(5):1952-1962.
- Jaeger K. E., Kinscher D. A., Koenig B. & Koenig W. (1992).** Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemistry and potential role as a virulence factor. Hoiby N. & Pedersen S. S. (Eds.), *Cystic fibrosis, basic and clinical research* (pp. 113-119). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

- Jaeger K. E., Dijkstra B. W. & Reetz M. T. (1999).** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:315-351.
- Jaeger K. E. & Eggert T. (2002).** Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**(4):390-397.
- Jang K. K., Lee Z. W., Kim B., Jung Y. H., Han H. J., Kim M. H., et al. (2017).** Identification and characterization of *Vibrio vulnificus* plpA encoding a phospholipase A2 essential for pathogenesis. *J. Biol. Chem.* **292**(41):17129-17143.
- Janssen W. A. & Surgalla M. J. (1968).** Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch. (*Rococcus americanus*). *J. Bacteriol.* **96**(5):1606-1610.
- Jensen R. B. (1983).** Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids* **18**:650-657.
- Jia A., Woo N. Y. & Zhang X. H. (2010).** Expression, purification, and characterization of thermolabile hemolysin (TLH) from *Vibrio alginolyticus*. *Dis. Aquat. Organ.* **90**(2):121-127.
- Jiang B. & Howard S. P. (1992).** The *Aeromonas hydrophila* exeE gene, required both for protein secretion and normal outer-membrane biogenesis, is a member of a general secretion pathway. *Mol. Microbiol.* **6**(10):1351-1361.
- Jiang F., Waterfield N. R., Yang J., Yang G. & Jin Q. (2014).** A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host Microbe* **15**(5):600-610.
- Jones C. J., Utada A., Davis K. R., Thongsomboon W., Zamorano Sanchez D., Banakar V., et al. (2015).** C-di-GMP regulates motile to sessile transition by modulating MshA pili biogenesis and near-surface motility behavior in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* **11**(10):e1005068.
- Joshi A., Kostiuk B., Rogers A., Teschler J., Pukatzki S. & Yildiz F. H. Rules of engagement: the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. *Trends Microbiol.* **25**(4):267-279.**

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Juncker A. S., Willenbrock H., von Heijne G., Nielsen H., Brunak S. & Krogh A. (2003).** Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* **12**(8):1652-1662.
- Just-Baringo X., Albericio F. & Alvarez M. (2014).** Thiopeptide antibiotics: retrospective and recent advances. *Mar. Drugs.* **12**(1):317-351.
- Kalburge S. S., Carpenter M. R., Rozovsky S. & Boyd E. F. (2017).** Quorum sensing regulators are required for metabolic fitness in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **85**(3):e00930-16.
- Kanchanopas-Barnette P., Labella A., Alonso C. M., Manchado M., Castro D. & Borrego J. J. (2009).** The first isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from asian seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Pathol.* **44**(1):47-50.
- Kang C. H., Oh K. H., Lee M. H., Oh T. K., Kim B. H. & Yoon J. (2011).** A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. *Microb. Cell Fact.* **10**:41.
- Kang J. H., Park J. H., Huh S. H. & Kong I. S. (1998).** Cloning and identification of a phospholipase gene from *Vibrio mimicus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**(1):85-89.
- Kaus K., Lary J. W., Cole J. L. & Olson R. (2014).** Glycan specificity of the *Vibrio vulnificus* hemolysin lectin outlines evolutionary history of membrane targeting by a toxin family. *J. Mol. Biol.* **426**(15):2800-2812.
- Kelley L. A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N. & E Sternberg M. J. (2015).** The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**(6):845-858.
<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>
- Ketterer P. J. & Eaves L. E. (1992).** Deaths in captive eels (*Anguila reinhardtii*) due to *Photobacterium* (*Vibrio*) *damsela*. *Aust. Vet. J.* **69**(8):203-204.
- Khalameyzer V., Fischer I., Bornscheuer U. T. & Altenbuchner J. (1999).** Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(2):477-482.

- Khatri I., Mahajan S., Dureja C., Subramanian S. & Raychaudhuri S. (2013).** Evidence of a new metabolic capacity in an emerging diarrheal pathogen: lessons from the draft genomes of *Vibrio fluvialis* strains PG41 and I21563. *Gut Pathog.* **5**(1):1757-4749.
- Khilwani B. & Chattopadhyay K. (2015).** Signaling beyond Punching Holes: Modulation of Cellular Responses by *Vibrio cholerae* Cytolysin. *Toxins (Basel)* **7**(8):3344-3358.
- Khouadja S., Lamari F., Bakhrouf A. & Gaddour K. (2014).** Virulence properties, biofilm formation and random amplified polymorphic DNA analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolates from cultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microb. Pathog.* **69-70**:13-19.
- Kim E. Y., Oh K. H., Lee M. H., Kang C. H., Oh T. K. & Yoon J. H. (2009b).** Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(1):257-260.
- Kim G. T., Lee J. Y., Huh S. H., Yu J. H. & Kong I. S. (1997).** Nucleotide sequence of the *vmhA* gene encoding hemolysin from *Vibrio mimicus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1360**(2):102-104.
- Kim H. R., Kim J. W., Lee M. K. & Kim J. G. (2009a).** Septicemia progressing to fatal hepatic dysfunction in an cirrhotic patient after oral ingestion of *Photobacterium damsela*: a case report. *Infection* **37**(6):555-556.
- Kim S. K., Yang J. Y. & Cha J. (2002).** Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04. *Gene* **283**(1-2):277-283.
- Kim Y. O., Khosasih V., Nam B. H., Lee S. J., Suwanto A. & Kim H. K. (2012).** Gene cloning and catalytic characterization of cold-adapted lipase of *Photobacterium* sp. MA1-3 isolated from blood clam. *J. Biosci. Bioeng.* **114**(6):589-595.

- Knight-Madden J. M., Barton M., Gandretti N., & Nicholson A. M. (2005).** *Photobacterium damsela* bacteremia in a child with sickle-cell disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**(7):654-655.
- König B., Jaeger K. E., Sage A. E., Vasil M. L. & König W. (1996).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes. *Infect. Immun.* **64**(8):3252-3258.
- Konovalova A. & Silhavy T. J. (2015).** Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **370**(1679):20150030.
- Koo B. S., Lee J. H., Kim S. C., Yoon H. Y., Kim K. A., Kwon K. B., et al. (2007).** Phospholipase A as a potent virulence factor of *Vibrio vulnificus*. *Int. J. Mol. Med.* **20**(6):913-918.
- Korotkov K. V., Sandkvist M. & Hol W. G. (2012).** The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**(5):336-351.
- Kothary M. H. & Kreger A. S. (1985).** Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* **49**(1):25-31.
- Kovach M. E., Elzer P. H., Hill D. S., Robertson G. T., Farris M. A., Roop R. M., et al. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**(1):175-176.
- Krantz B. A., Finkelstein A. & Collier R. J. (2006).** Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. *J. Mol. Biol.* **355**(5):968-979.
- Krasilnikov O. V., Merzlyak P. G., Lima V. L., Zitzer A. O., Valeva A. & Yuldasheva L. N. (2007).** Pore formation by *Vibrio cholerae* cytolysin requires cholesterol in both monolayers of the target membrane. *Biochimie.* **89**(3):271-277.
- Kreger A. S. (1984).** Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.* **44**(2):326-331.

- Kreger A. S., Bernheimer A. W., Etkin L. A. & Daniel L. W. (1987).** Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infect. Immun.* **55**(12):3209-3212.
- Kulkarni R., Dhakal B. K., Slechta E. S., Kurtz Z., Mulvey M. A. & Thanassi D. G. (2009).** Roles of putative type II secretion and type IV pilus systems in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One* **4**(3):e4752.
- Labella A., Vida M., Alonso M. C., Infante C., Cardenas S., López-Romalde S., et al. (2006).** First isolation of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* from cultured redbanded seabream, *Pagrus auriga* Valenciennes, in Spain. *J. Fish Dis.* **29**(3):175-179.
- Labella A., Sanchez-Montes N., Berbel C., Aparicio M., Castro D., Manchado M., et al. (2010a).** Toxicity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains isolated from new cultured marine fish. *Dis. Aquat. Org.* **92**(1):31-40.
- Labella A., Manchado M., Alonso M. C., Castro D., Romalde J. L. & Borrego J. J. (2010b).** Molecular intraspecific characterization of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* strains affecting cultured marine fish. *J. Appl. Microbiol.* **108**(6):2122-2132.
- Labella A., Berbel C., Manchado M., Castro D. & Borrego J. J. (2011).** “*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen affecting new cultured marine fish species in southern Spain. Faruk A. & Zafer D. (Eds.), *Recent Advances in Fish Farms* (pp. 135-152). New York: InTech.
- Lafferty K. D., Harvell C. D., Conrad J. M., Friedman C. S., Kent M. L., Kuris A. M., et al. (2015).** Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **7**:471-496.
- Lang C. & Flieger A. (2011).** Characterization of *Legionella pneumophila* phospholipases and their impact on host cells. *Eur. J. Cell Biol.* **90**(11):903-912.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lawson D. A. & Meyer T. F. (1992).** Biochemical characterization of *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis* collagenase. *Infect. Immun.* **60**(4):1524-1529.
- Lee C. Y., Su S. C. & Liaw R. B. (1995).** Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology* **141**(Pt 10):2569-2576.
- Lee J. H., Kim G. T., Lee J. Y., Jun H. K., Yu J. H. & Kong I. S. (1998).** Isolation and sequence analysis of metalloprotease gene from *Vibrio mimicus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1384**(1):1-6.
- Lee J. H., Ahn S. H., Kim S. H., Choi Y. H., Park K. J. & Kong I. S. (2002).** Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhlA) and cytotoxicity on fish cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**(2):269-276.
- Lee J. H., Ahn S. H., Lee E. M., Kim Y. O., Lee S. J. & Kong I. S. (2003).** Characterization of the enzyme activity of an extracellular metalloprotease (VMC) from *Vibrio mimicus* and its C-terminal deletions. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**(2):293-300.
- Lee J. H., Ahn S. H., Lee E. M., Jeong S. H., Kim Y. O., Lee S. J., et al. (2005).** The FAXWXXT motif in the carboxyl terminus of *Vibrio mimicus* metalloprotease is involved in binding to collagen. *FEBS Lett.* **579**(11):2507-2513.
- Lee M. H., Lee C. H., Oh T. K., Song J. K. & Yoon J. H. (2006).** Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(11):7406-7409.
- Lee M. H., Hong K. S., Malhotra S., Park J. H., Hwang E. C., et al. (2010).** A new esterase EstD2 isolated from plant rhizosphere soil metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**(5):1125-1134.
- Lenfant N., Hotelier T., Velluet E., Bourne Y., Pascale M. & Chatonnet A. (2013).** ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Res.* **41**(Database issue):D423-D429. <http://bioweb.ensam.inra.fr/esther>.

- Leo J. C., Grin I. & Linke D. (2012).** Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**(1592):1088-1101.
- Leščić Ašler I., Štefanić Z., Maršavelski A., Vianello R. & Kojić-Prodić B. (2017).** Catalytic Dyad in the SGNH Hydrolase Superfamily: In-depth Insight into Structural Parameters Tuning the Catalytic Process of Extracellular Lipase from *Streptomyces rimosus*. *ACS Chem. Biol.* **12**(7):1928-1936.
- Letunic I. & Bork P. (2017).** 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **46**(D1):D493-D496. <http://smart.embl-heidelberg.de/>
- Levisson M., Oost J. V. & Kengen S. W. (2007).** Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritime*. *FEBS. J.* **274**(11):2832-2842.
- Li Y., Okamoto K., Takahashi E., Miyoshi S., Shinoda S., Tsuji T., et al. (2005).** A hemolysin of *Vibrio mimicus* (VMH) stimulates cells to produce ATP and cyclic AMP which appear to be secretory mediators. *Microbiol. Immunol.* **49**(1):73-78.
- Li L., Mou X. & Nelson D. R. (2013).** Characterization of Plp, a phosphatidylcholine-specific phospholipase and hemolysin of *Vibrio anguillarum*. *BMC Microbiol.* **13**:271-285.
- Li M. F., Wang C. & Sun L. (2015).** *Edwardsiella tarda* MliC, a lysozyme inhibitor that participates in pathogenesis in a manner that parallels Ivy. *Infect. Immun.* **83**(2):583-590.
- Lightfield J., Fram N. R. & Ely B. (2011).** Across bacterial phyla, distantly related genomes with similar genomic GC content have similar patterns of amino acid usage. *PLoS One* **6**(3):e17677.
- Lilley B. N. & Bassler B. L. (2000).** Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Mol. Microbiol.* **36**(4):940-954.
- Lim D. V., Jackson R. J., & Pull-VonGruenigen C. M. (1993).** Purification and assay of bacterial collagenases. *J. Microbiol. Methods* **18**(3):241-253.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lim Y. S., Wang T., Oh W. S. & Kim J. W. (2012).** Overexpression and characterization of a thermophilic and hemolytic phospholipase of *Vibrio vulnificus* cloned in *Escherichia coli* (phospholipase of *V. vulnificus*). *Afr. J. Biotechnol.* **11**(58):12213-12221.
- Liu F., Liu G. & Li F. (2016).** Characterization of two pathogenic *Photobacterium* strains isolated from *Exopalaemon carinicauda* causing mortality of shrimp. *Aquaculture* **464**:129-135.
- Liu P. V. (1957).** Survey of hemolysin production among species of pseudomonads. *J. Bacteriol.* **74**(6):718-727.
- Liu P., Wang Y. F., Ewis H. E., Abdelal A. T., Lu C. D., Harrison R. W., et al. (2004).** Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30. *J. Mol. Biol.* **342**(2):551-561.
- Lo Y. C., Lin S. C., Shaw J. F. & Liaw Y. C. (2003).** Crystal structure of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/lysophospholipase L₁: consensus sequence blocks constitute the catalytic center of SGNH-hydrolases through a conserved hydrogen bond network. *J. Mol. Biol.* **330**(3):539-551.
- Lohner S., Walev I., Boukhallouk F., Palmer M., Bhakdi S & Valeva A. (2009).** Pore formation by *Vibrio cholerae* cytolysin follows the same archetypical mode as beta-barrel toxins from gram-positive organisms. *FASEB J.* **23**(8):2521-2528.
- Longshaw C. M., Farrell A. M., Wright J. D. & Holland K. T. (2000).** Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. *Microbiology* **146**(6):1419-1427.
- Los F. C., Randis T. M., Aroian R. V. & Ratner A. J. (2013).** Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**(2):173-207.
- Los F. C. & Ratner A. J. (2014).** Pore-forming toxins in bacterial infections: targets for novel drugs. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **158**:A6668.
- Love M., Teebkenfisher D., Hose J. E., Farmer J. J., Hickman F. W. & Fanning G. R. (1981).** *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin

ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science*. **214**(4525):1139-1140.

Lozano-León A., Osorio C. R., Núñez S., Martínez-Urtaza J. & Magariños B. (2003). Occurrence of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in bivalve molluscs from Northwest Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **23**(1):40-44.

Luan X. Y., Chen J. X., Zhang X. H., Jia J. T., Sun F. R. & Li Y. (2007). Comparison of different primers for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**(3):242-247.

Luo H. & Moran M. A. (2015). How do divergent ecological strategies emerge among marine bacterioplankton lineages?. *Trends Microbiol.* **23**(9):1-18.

MacDonell M. T. & Colwell R. R. (1984). The nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from *Vibrio marinus*. *Microbiol. Sci.* **1**(9):229-231.

Macfarlane R. G., Oakley C. L. & Anderson C. G. (1941). Hemolysis and the production of opalescence in serum and lecithovitellin by the alpha toxin of *Clostridium perfringens*. *J. Pathol. Bacteriol.* **52**:99-103.

Machado H., Giubergia S., Mateiu R. V. & Gram L. (2015). *Photobacterium galathea* sp. nov., a bioactive bacterium isolated from a mussel in the Solomon Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**(12):4503-4507.

Machado H. & Gram L. (2017). Comparative Genomics Reveals High Genomic Diversity in the Genus *Photobacterium*. *Front. Microbiol.* **8**:1204.

Malito E., Biancucci M., Faleri A., Ferlenghi I., Scarselli M., Maruggi G., et al. (2014). Structure of the meningococcal vaccine antigen NadA and epitope mapping of a bactericidal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**(48):17128-17133.

Margesin R., Walder G. & Schinner F. (2003). Bioremediation Assessment of a BTEX-Contaminated Soil. *Acta Biotechnol.* **23**(1):29-36.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Marsh J. W. & Taylor R. K. (1999).** Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J. Bacteriol.* **181**(4):1110-1117.
- Martinez-Jéhanne V., du Merle L., Bernier-Fébreau C., Usein C., Gassama-Sow A., Wane A. A., et al. (2009).** Role of deoxyribose catabolism in colonization of the murine intestine by pathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* **77**(4):1442-14450.
- Matsushita O., Yoshihara K., Katayama S., Minami J. & Okabe A. (1994).** Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J. Bacteriol.* **176**(1):149-156.
- Matsushita O., Jung C. M., Katayama S., Minami J., Takahashi Y. & Okabe A. (1999).** Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. *J. Bacteriol.* **181**(3):923-33.
- Matsushita O. & Okabe A. (2001).** Clostridial hydrolytic enzymes degrading extracellular components. *Toxicon.* **39**(11):1769-1780.
- Mazumdar B., Ganguly S., Ghosh A. N. & Banerjee K. K. (2011).** The role of Cterminus carbohydrate-binding domain of *Vibrio cholerae* haemolysin/cytolysin in the conversion of the pre-pore beta-barrel oligomer to a functional diffusion channel. *Indian. J. Med. Res.* **133**:131-137.
- Mc Faddin J. F. (1993).** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Méjico: Editorial Médica Panamericana.
- Mergulhão F. J. M., Summers D. K. & Monteiro G. A. (2005).** Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* **23**(3):177-202.
- Merino S., Aguilar A., Nogueras M. M., Regue M., Swift S. & Tomas J. M. (1999).** Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect. Immun.* **67**(8):4008-4013.
- Méthot P. O. & Alizon S. (2014).** What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence* **5**(8):775-785.

- Mil-Homens D. & Fialho A. M. (2011).** Trimeric autotransporter adhesins in members of the *Burkholderia cepacia* complex: a multifunctional family of proteins implicated in virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **1**:13.
- Milton D. L., Norqvist A. & Wolf-Watz H. (1992).** Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **174**(22):7235-7244.
- Miskin J. E., Farrell A. M., Cunliffe W. J. & Holland K. T. (1997).** *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. *Microbiology* **143**(5):1745-1755.
- Miyake M., Honda T. & Miwatani T. (1988).** Purification and characterization of *Vibrio metschnikovii* cytolysin. *Infect. Immun.* **56**(4):954-960.
- Miyoshi S., Sasahara K., Akamatsu S., Rahman M. M., Katsu T., Tomochika K., et al. (1997).** Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. *Infect. Immun.* **65**(5):1830-1835.
- Miyoshi S. (2013).** Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic *vibrio* species. *Front. Microbiol.* **4**:339.
- Moi I. M., Roslan N. N., Leow A. T. C., Ali M. S. M., Rahman R. N. Z. R. A., Rahimpour A., et al. (2017).** The biology and the importance of *Photobacterium* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**(11):4371-4385.
- Mølgaard A., Kauppinen S. & Larsen S. (2000).** Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* **8**(4):373-383.
- Mollby R. (1978).** Bacterial phospholipases. Jeljaszewicz, J. & Wadstrom, T. (Eds.), *Bacterial Toxins and Cell Membranes* (pp. 367-424). London: Academic Press, Inc. Ltd.
- Monturiol-Gross L., Flores-Díaz M., Araya-Castillo C., Pineda-Padilla M. J., Clark G. C., Titball R.W., et al. (2012).** Reactive oxygen species and the MEK/ERK pathway are involved in the toxicity of *Clostridium*

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

perfringens α -toxin, a prototype bacterial phospholipase C. *J. Infect. Dis.* **206**(8):1218-1226.

Monturiol-Gross L., Flores-Díaz M., Campos-Rodríguez D., Mora R., Rodríguez-Vega M., Marks D. L., et al. (2014). Internalization of *Clostridium perfringens* α -toxin leads to ERK activation and is involved on its cytotoxic effect. *Cell. Microbiol.* **16**(4):535-547.

Mookhtiar K. A. & Van Wart H. E. (1992). *Clostridium histolyticum* collagenases: a new look at some old enzymes. *Matrix Suppl.* **1**:116-126.

Morris J. G., Wilson R., Hollis D. G., Weaver R. E., Miller H. G., Tacket C. O., et al. (1982). Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. *Lancet.* **1**(8284):1294-1297.

Morris J. J., Lenski R. E. & Zinser E. R. (2012). The black queen hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *MBio* **3**(2):e00036-12.

Moschioni M., Tombola F., de Bernard M., Coelho A., Zitzer A., Zoratti M. et al. (2002). The *Vibrio cholerae* haemolysin anion channel is required for cell vacuolation and death. *Cell. Microbiol.* **4**(7):397-409.

Mouriño S., Osorio C. R. & Lemos M. L. (2004). Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **186**(18):6159-6167.

Mukherjee A., Ganguly S., Chatterjee N. S. & Banerjee K. K. (2016). *Vibrio cholerae* hemolysin: The β -trefoil domain is required for folding to the native conformation. *Biochem. Biophys. Rep.* **8**:242-248.

Mukherjee J., Webster N. & Llewellyn L. E. (2009). Purification and characterization of a collagenolytic enzyme from a pathogen of the great barrier reef sponge, *Rhopaloeides odorabile*. *PLoS One* **4**(9):7172-7177.

- Nagamune K., Yamamoto K., Naka A., Matsuyama J., Miwatani T. & Honda T. (1996).** In vitro proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae*, trypsin, and other proteases. *Infect. Immun.* **64**(11):4655-4658.
- Nagamune K., Yamamoto K. & Honda T. (1997).** Intramolecular chaperone activity of the pro-region of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin. *J. Biol. Chem.* **272**(2):1338-1343.
- Nagiec M. J., Lei B., Parker S. K., Vasil M. L., Matsumoto M., Ireland R. M., et al. (2004).** Analysis of a novel prophageencoded group A *Streptococcus* extracellular phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **279**:45909-45918.
- Naka H., Hirono I. & Aoki T. (2007).** Cloning and characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* phospholipase: an enzyme that shows haemolytic activity. *J. Fish Dis.* **30**(11):681-690.
- Naka H., Dias G. M., Thompson C. C., Dubay C., Thompson F. L. & Crosa J. H. (2011).** Complete genome sequence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* harboring the pJM1 virulence plasmid and genomic comparison with other virulent strains of *V. anguillarum* and *V. ordalii*. *Infect. Immun.* **79**(7):2889-2900.
- Nakamura Y., Uchihira M., Ichimiya M., Morita K. & Muto M. (2008).** Necrotizing fasciitis of the leg due to *Photobacterium damsela*. *J. Dermatol.* **35**(1):44-45.
- Narita S. I. & Tokuda H. (2017).** Bacterial lipoproteins; biogenesis, sorting and quality control. *Biochim. Biophys. Acta* **1862**(11):1414-1423.
- Natale P., Brüser T. & Driessen A. J. (2008).** Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**(9):1735-1756.
- Navarro-González, I. & Periago M. J. (2012).** Propiedades de enzimas lipolíticas bacterianas y aplicaciones. *An. Vet. (Murcia)*. **28**:45-65.
- Nelson D. L. & Cox M. M. (2003).** *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd ed. New York: Worth Publishers.

- Nesta B., Spraggon G., Alteri C., Moriel D. G., Rosini R., Veggi D., et al. (2012).** FdeC, a novel broadly conserved *Escherichia coli* adhesin eliciting protection against urinary tract infections. *MBio*. **3**(2):e00010-12.
- Nielsen P. H., Roslev P., Dueholm T. E. & Nielsen J. L. (2002).** *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic-aerobic activated sludge plants. *Water Sci. Technol.* **46**(1-2):73-80.
- Nikolova-Karakashian M. N. & Rozenova K. A. (2010).** Ceramide in stress response. *Adv. Exp. Med. Biol.* **688**:86-108.
- Nishizuka Y. (1992).** Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**(5082):607-613.
- Nummelin H., Merckel M. C., Leo J. C., Lankinen H., Skurnik M. & Goldman A. (2004).** The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J.* **23**(4):701-711.
- Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A. A., Korobeynikov A., Lapidus A., et al. (2013).** Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads. Deng M., Jiang R., Sun F. & Zhang X. (Eds.), *Lecture notes in computer science* (pp. 158-170). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Obendorf D. L., Carson J. & Mcmanus T. J. (1987).** *Vibrio damsela* infection in a stranded leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Wildl. Dis.* **23**(4):666-668.
- Ogierman M. A., Fallarino A., Riess T., Williams S. G., Attridge S. R. & Manning P. A. (1997).** Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon *lipAB* and a protease gene downstream of the *hly* region. *J. Bacteriol.* **179**(22):7072-7080.
- Okada K., Iida T., Kita-Tsukamoto K. & Honda T. (2005).** Vibrios commonly possess two chromosomes. *J. Bacteriol.* **187**(2):752-757.
- Okuda S. & Tokuda H. (2011).** Lipoprotein sorting in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**:239-259.

- Olempska-Beer Z. S., Merker R. I., Ditto M. D. & DiNovi M. J. (2006).** Food processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **45**(2):144-158.
- Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., et al. (1992).** The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**(3):197-211.
- Olson R. & Gouaux E. (2003).** *Vibrio cholerae* cytolysin is composed of an alphahemolysin-like core. *Protein Sci.* **12**(2):379-383.
- Olson R. & Gouaux E. (2005).** Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) pro-toxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore. *J. Mol. Biol.* **350**(5):997-1016.
- Ono T., Park K. S., Ueta M., Iida T. & Honda T. (2006).** Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. *Infect. Immun.* **74**(2):1032-1042.
- Orfanoudaki G., Markaki M., Chatzi K., Tsamardinos I. & Economou A. (2017).** MatureP: prediction of secreted proteins with exclusive information from their mature regions. *Sci. Rep.* **7**(1):3263. <http://stepdb.eu/MatureP.php>
- Osorio C. R., Romalde J. L., Barja J. L. & Toranzo A. E. (2000a).** Presence of phospholipase-D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microb. Pathog.* **28**(2):119-126.
- Osorio C. R., Toranzo A. E., Romalde J. L. & Barja J. L. (2000b).** Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Dis. Aquat. Organ.* **40**(3):177-183.
- Osorio C. R., Juiz-Río S. & Lemos M. L. (2010).** The ABC-transporter *hutCD* genes of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are essential for haem utilization as iron source and are expressed during infection in fish. *J. Fish Dis.* **33**(8):649-655.
- Otto B. R., Sijbrandi R., Luirink J., Oudega B., Heddle J. G., Mizutani K., et al. (2005).** Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**(17):17339-17345.

Overbeek R., Olson R., Pusch G. D., Olsen G. J., Davis J. J., Disz T., et al. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* **42**(Database issue):D206-14.

Pacaud M. & Uriel J. (1971). Isolation and some properties of a proteolytic enzyme from *Escherichia coli* (Protease I). *Eur. J. Biochem.* **23**(1971):435-442.

Pajuelo D., Lee C. T., Roig F. J., Hor L. I. & Amaro C. (2015). Novel host-specific iron acquisition system in the zoonotic pathogen *Vibrio vulnificus*. *Environ. Microbiol.* **17**(6):2076-2089.

Pal G. K. & Suresh P. V. (2016). Microbial collagenases: Challenges and prospect in production and potential applications in food and nutrition. *RSC Adv.* **6**:33763-33780.

Palmer T. & Berks B. C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**(7):483-496.

Papanikou E., Karamanou S. & Economou A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**(11):839-851.

Paranjpye R. N & Strom M. S. (2005). A *Vibrio vulnificus* Type IV Pilin Contributes to Biofilm Formation, Adherence to Epithelial Cells, and Virulence. *Infect. Immun.* **73**(3):1411-1422.

Park B. R., Zielke R. A., Wierzbicki I. H., Mitchell K. C., Withey J. H. & Sikora A. E. (2015). A Metalloprotease Secreted by the Type II Secretion System Links *Vibrio cholerae* with Collagen. *J. Bacteriol.* **197**(6):1051-1064.

Park Y. D., Baik K. S., Seong C. N., Bae K. S., Kim S. & Chun J. (2006). *Photobacterium ganghwense* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**(Pt 4):745-749.

- Paul K. & Chattopadhyay K. (2011).** Unfolding distinguishes the *Vibrio cholera* cytolysin precursor from the mature form of the toxin. *Biochemistry* **50**(19):3936-3945.
- Pazos F., Santos Y., Magariños B., Bandín I., Núñez S. & Toranzo E. (1993).** Phenotypic Characteristics and Virulence of *Vibrio anguillarum*-Related Organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(9):2969-2976.
- Pedersen K., Dalsgaard I. & Larsen J. L. (1997).** *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(9):3711-3715.
- Pedersen K., Skall H. F., Lassen-Nielsen A. M., Bjerrum L. & Olesen N. J. (2009).** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen in Danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture. *J. Fish. Dis.* **32**(5):465-472.
- Petersen T. N., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H. (2011).** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.* **8**(10):785-786. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- Pérez M. J., Rodríguez L. A. & Nieto T. P. (1998).** The acetylcholinesterase ichthyotoxin is a common component in the extracellular products of *Vibrionaceae* strains. *J. Appl. Microbiol.* **84**(1):47-52.
- Pérez-Tirse J., Levine J. F. & Mecca M. (1993).** *Vibrio damsela*: a cause of fulminant septicemia. *Arch. Intern. Med.* **153**(15):1838-1840.
- Peterson J. W. (1996).** Chapter 7: Bacterial Pathogenesis. Baron S. (Ed.), *Medical Microbiology*, 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8526/>
- Peterson K. M. & Mekalanos J. J. (1988).** Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect. Immun.* **56**(11):2822-2829.

- Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., et al. (2004).** UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**(13):1605-1612.
- Plou F. J., Ferrer M., Nuero O. M., Calvo M. V., Alcalde M., Reyes F., et al. (1998).** Analysis of Tween 80 as an esterase/ lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnol. Lett.* **12**(3):183-186.
- Popoff M. R. & Bouvet P. (2009).** Clostridial toxins. *Future Microbiol.* **4**(8):1021-1064.
- Portnoy D. A., Chakraborty T., Goebel W. & Cossart P. (1992).** Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* **60**(4):1263-1267.
- Poussin M. A., Leitges M. & Goldfine H. (2009).** The ability of *Listeria monocytogenes* PI-PLC to facilitate escape from the macrophage phagosome is dependent on host PKC. *Microb. Pathog.* **46**(1):1-5.
- Prabaharan M. (2015).** Bioactivity of chitosan derivatives. Ramawat K. G. & Mérillon J. M. (Eds.), *Polysaccharides: bioactivity and biotechnology* (pp. 1609-1625). Gewerbestrasse: Springer International Publishing.
- Pride A. C., Herrera C. M., Guan Z., Giles D. K. & Trent M. S. (2013).** The outer surface lipoprotein VolA mediates utilization of exogenous lipids by *Vibrio cholerae*. *MBio.* **4**(3):e00305-13.
- Pride A. C., Guan Z. & Trent M. S. (2014).** Characterization of the *Vibrio cholerae* VolA surface-exposed lipoprotein lysophospholipase. *J. Bacteriol.* **196**(8):1619-1626.
- Puentes B., Balado M., Bermúdez-Crespo J., Osorio C. R. & Lemos M. L. (2017).** A proteomic analysis of the iron response of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* reveals metabolic adaptations to iron levels changes and novel potential virulence factors. *Vet. Microbiol.* **201**:257-264.
- Pugsley A. P., Chapon C. & Schwartz M. (1986).** Extracellular Pullulanase of *Klebsiella pneumoniae* Is a Lipoprotein. *J. Bacteriol.* **166**(3):1083-1088.

- Pujalte M. J., Sitja-Bobadilla A., Álvarez-Pellitero P. & Garay E. (2003).** Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in mediterranean fish farms. *Dis. Aquat. Org.* **54**(2):119-126.
- Raghunathan D., Wells T. J., Morris F. C., Shaw R. K., Bobat S., Peters S. E., et al. (2011).** SadA, a trimeric autotransporter from *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, can promote biofilm formation and provides limited protection against infection. *Infect Immun.* **79**(11):4342-4352.
- Ramachandran G. N. (1988).** Stereochemistry of collagen. *Int. J. Pept. Protein Res.* **31**(1):1-16.
- Ramirez J. C., Fleiszig S. M., Sullivan A. B., Tam C., Borazjani R. & Evans D. J. (2012).** Traversal of multilayered corneal epithelia by cytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* requires the phospholipase domain of exoU. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**(1):448-453.
- Ramnath L., Sithole B. & Govinden R. (2017).** Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Can. J. Microbiol.* **63**(3):179-192.
- Ranjitha P., Karthy E. S. & Mohankumar A. (2009).** Purification and Characterization of the Lipase from Marine *Vibrio fischeri*. *Int. J. Biol.* **1**(2):48-56.
- Rao L., Xue Y., Zhou C., Tao S., Li G., Lu J. R., et al. (2011).** A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**(12):1695-1702.
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. & Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(3):597-635.
- Rawlings N. D., Barrett A. J. & Finn R.D. (2016).** Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **44**(D1):D343-D350. <https://www.ebi.ac.uk/merops/>
- Ray V. A. & Visick K. L. (2012).** LuxU connects quorum sensing to biofilm formation in *Vibrio fischeri*. *Mol. Microbiol.* **86**(4):954-970.

- Reen F. J., Almagro-Moreno S., Ussery D. & Boyd E. F. (2006).** The genomic code: inferring *Vibrionaceae* niche specialization. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**(9):697-704.
- Renault T., Haffner, P. Malfondet C. & Weppe M. (1994).** *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortalities in cultured sea bass (*Lates calcarifer*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **14**(4):117-119.
- Ricard-Blum S. (2011).** The collagen family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**(1):a004978.
- Rico R. M., Tapia-Paniagua S., Martínez-Manzanares E., Balebona M. C. & Moriñigo M. A. (2008).** Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *J. Appl. Microbiol.* **105**(3):752-760.
- Rio S. J., Osorio C. R., & Lemos M. L. (2005).** Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of *hutA* pseudo-genes. *Arch. Microbiol.* **183**(5):347-358.
- Riss T. L., Moravec R. A. & Niles A. L. (2011).** Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods Mol. Biol.* **740**:103-114.
- Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink H. A., Worzella T. J., et al. (2016).** Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Rivas A. J., Balado M., Lemos M. L. & Osorio C. R. (2011).** The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid. *Infect. Immun.* **79**(11):4617-4627.
- Rivas A. J., Lemos M. L. & Osorio C. R. (2013a).** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Front. Microbiol.* **4**:283.
- Rivas A. J., Balado M., Lemos M. L. & Osorio C. R. (2013b).** Synergistic and additive effects of chromosomal and plasmid-encoded hemolysins

contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infect. Immun.* **81**(9):3287-3299.

Rivas A. J., Labella A. M., Borrego J. J., Lemos M. L. & Osorio C. R. (2014). Evidence for horizontal gene transfer, gene duplication and genetic variation as driving forces of the diversity of haemolytic phenotypes in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *FEMS Microbiol. Lett.* **355**(2):152-162.

Rivas A. J., von Hoven G., Neukirch C., Meyenburg M., Qin Q., Füser S., et al. (2015a). Phobalysin, a Small β -Pore-Forming Toxin of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infect. Immun.* **83**(11):4335-4348.

Rivas A. J., Vences A., Husmann M., Lemos M. L. & Osorio C. R. (2015b). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors Dly, plasmidencoded HlyA, and chromosome-encoded HlyA are secreted via the type II secretion system. *Infect. Immun.* **83**(4):1246-1256.

Ro H. S., Hong H. P., Kho B. H., Kim S. & Chung B. H. (2004). Genome-wide cloning and characterization of microbial esterases. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**(1):97-105.

Roberts D. M., Personne Y., Ollinger J. & Parish T. (2013). Proteases in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis: potential as drug targets. *Future Microbiol.* **8**(5):621-631.

Rock J. L. & Nelson D. R. (2006). Identification and characterization of a hemolysin gene cluster in *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **74**(5):2777-2786.

Rodgers C. J. & Furones M. D. (1998). Disease problems in cultured marine fish in the Mediterranean. *Fish Pathol.* **33**(4):157-164.

Rollof J., Braconier J. H., Söderström C. & Nilsson-Ehle P. (1988). Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**(4):505-510.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rosenau F. & Jaeger K. (2000).** Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie*. **82**(11):1023-1032.
- Russell A. B., LeRoux M., Hathazi K., Agnello D. M., Ishikawa T., Wiggins P. A., et al. (2013).** Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* **496**(7446):508-512.
- Ryu H. S., Kim H. K., Choi W. C., Kim M. H., Park S. Y., Han N. S., et al. (2006).** New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**(3):321-326.
- Saha R., Saha N., Donofrio R. S. & Bestervelt L. L. (2013).** Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* **53**(4):303-317.
- Saitou N. & Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**(4):406-425.
- Salacha R., Kovacic F., Brochier-Armanet C., Wilhelm S., Tommassen J., Filloux A., et al. (2010).** The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ. Microbiol.* **12**(6):1498-1512.
- Salyers A. & Witt D. (1994).** Virulence factors that promote colonization. Salyers A. & Witt D. (Eds.), *Bacterial pathogenesis: a molecular approach* (pp. 30-46). Washington, D.C.: ASM Press.
- Sambrook J. & Russell D. W. (2001).** *Molecular cloning: A laboratory manual*. ed 3. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Samuelsson B. (1983).** Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**(4597):568-5675.
- Sandkvist M., Michel L. O., Hough L. P., Morales V. M., Bagdasarian M., Koomey M., et al. (1997).** General secretion pathway (*eps*) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **179**(22):6994-7003.

- Sandkvist M. (2001).** Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* **40**(2):271-283.
- Sato H. & Frank D. W. (2014).** Intoxication of host cells by the T3SS phospholipase ExoU: PI(4,5)2-associated, cytoskeletal collapse and late phase membrane blebbing. *PLoS One* **9**(7):e103127.
- Schaller K. & Nomura M. (1976).** Colicin E2 is DNA endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**(11):3989-3993.
- Schiewe M. H., Trust T. J. & Crosa J. H. (1981).** *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of vibriosis in fish. *Curr. Microbiol.* **6**(6):343-348.
- Schmid R. D. & Verger R. (1998).** Lipases: Interfacial enzymes with attractive application. *Angew. Chem.* **37**(12):1608-1633.
- Schmidt H. & Hensel M. (2004).** Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**(1):14-56.
- Schmiel D. H., Wagar E., Karamanou L., Weeks D. & Miller V. L. (1998).** Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect. Immun.* **66**(8):3941-3951.
- Schmiel D. H. & Miller V. L. (1999).** Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **1**(13):1103-1112.
- Schrag J. D., Li Y., Wu S. & Cygler M. (1991).** Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**(6329):761-764.
- Schunder E., Adam P., Higa F., Remer K. A., Lorenz U., Bender J., et al. (2010).** Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *J. Med. Microbiol.* **300**(5):313-323.
- Seddon S., Hemingway I. & Borriello S. (1990).** Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. *J. Med. Microbiol.* **31**(3):169-174.
- Serracca L., Ercolini C., Rossini I., Battistini R., Giorgi I. & Prearo M. (2011).** Occurrence of both subspecies of *Photobacterium damsela* in

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- mulletts collected in the river Magra (Italy). *Can. J. Microbiol.* **57**(5):437-440.
- Seshadri R., Joseph S. W., Chopra A. K., Sha J., Shaw J., Graf J., et al. (2006).** Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J. Bacteriol.* **188**(23):8272-8282.
- Shabtai Y. (1991).** Isolation and characterization of a lipolytic bacterium capable of growing in a low-water-content oil-water emulsion. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(6):1740-1745.
- Sharma S. R. K., Pradeep M. A., Sadu N., Dube P. N. & Vijayan K. K. (2017).** First report of isolation and characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from cage-farmed cobia (*Rachycentron canadum*). *J. Fish Dis.* **40**(7):953-958.
- Shin J. H., Shin M. G., Suh S. P., Ryang D. W., Rew J. S. & Nolte F. S. (1996).** Primary *Vibrio damsela* septicemia. *Clin. Infect. Dis.* **22**(5):856-857.
- Shin S. Y., Lee J. H., Huh S. H., Park Y. S., Kim J. M. & Kong I. S. (2000).** Overexpression and characterization of *Vibrio mimicus* metalloprotease. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**(5):612-619.
- Shinoda S., Matsuoka H., Tsuchie T., Miyoshi S., Yamamoto S., Taniguchi H., et al. (1991).** Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *J. Gen. Microbiol.* **137**(12):2705-2711.
- Shinoda S., Ishida K., Oh E. G., Sasahara K., Miyoshi S., Chowdhury M. A., et al. (1993).** Studies on hemolytic action of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. *Microbiol. Immunol.* **37**(5):405-409.
- Shinoda S. & Miyoshi S. (2011).** Proteases produced by Vibrios. *Biocontrol. Sci.* **16**(1):1-11.
- Sierra G. (1957).** A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **23**:15-22.

- Sievers F., Wilm A., Dineen D. G., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., et al. (2011).** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**:539 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- Sikora A. E., Zielke R. A., Lawrence D. A., Andrews P. C. & Sandkvist M. (2011).** Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three related serine proteases. *J. Biol. Chem.* **286**(19):16555-16566.
- Sikora A. E. (2013).** Proteins Secreted via the Type II Secretion System: Smart Strategies of *Vibrio cholerae* to Maintain Fitness in Different Ecological Niches. *PLoS Pathog.* **9**(2):e1003126.
- Sitaraman R., Israel D. A., Romero-Gallo J. & Peek R. M. J. (2012).** Cell associated hemolysis induced by *Helicobacter pylori* is mediated by phospholipases with mitogen-activated protein kinase-activating properties. *J. Clin. Microbiol.* **50**(3):1014-1018.
- Sitkiewicz I., Stockbauer K. E. & Musser J. M. (2007).** Secreted bacterial phospholipase A₂ enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol.* **15**(2):63-69.
- Smith G. C. & Merkel J. R. (1982).** Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*: Potential contribution to its invasiveness. *Infect. Immun.* **35**(3):1155-1156.
- Smith S. K., Sutton D. C., Fuerst J. A. & Reichelt J. L. (1991).** Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love et al.) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**(4):529-534.
- Snieszko S. F., Bullock G. L., Hollis E. & Boone J. G. (1964).** *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.* **88**:1814-815.
- Soares G., Silva B. A., Santos M. H. B., da Costa A. F., Dos Santos A. L., Morandi V., et al. (2008).** Metallopeptidases produced by group B *Streptococcus*: influence of proteolytic inhibitors on growth and on interaction with human cell lineages. *Int. J. Mol. Med.* **22**(1):119-125.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Song L., Huang Y., Zhao M., Wang Z., Wang S., Sun H., et al. (2015).** A critical role for hemolysin in *Vibrio fluvialis*-induced IL-1 β secretion mediated by the NLRP3 inflammasome in macrophages. *Front. Microbiol.* **6**:510.
- Song Y. L., Cheng W. & Wang C. H. (1993).** Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *J. Invertebr. Pathol.* **61**(1):24-31.
- Songer J. G. (1997).** Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* **5**(4):156-161.
- Stahl J., Bergmann H., Göttig S., Ebersberger I. & Averhoff B. (2015).** *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. *PLoS One* **10**(9):e0138360.
- Stancevic B. & Kolesnick R. (2010).** Ceramide-rich platforms in transmembrana signaling. *FEBS Lett.* **584**(9):1728-1740.
- Stehr F., Kretschmar M., Kröger C., Hube B. & Schäfer W. (2003).** Microbial lipases as virulence factors. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **22**(5-6):347-355.
- Stothard P. (2000).** The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28**(6):1102-1104. <https://sites.ualberta.ca/~stothard/javascript/index.html>
- Straus D. C., Lonon M. K. & Hutson J. C. (1992).** Inhibition of rat alveolar macrophage phagocytic function by a *Pseudomonas cepacia* lipase. *J. Med. Microbiol.* **37**(5):335-340.
- Strickland J. A., Orr G. L. & Walsh T. A. (1995).** Inhibition of Diabrotica larval growth by patatin, the lipid acyl hydrolase from potato tubers. *Plant Physiol.* **109**(2):667-674.
- Su J. H., Chang M. C., Lee Y. S., Tseng I. C. & Chuang Y. C. (2004).** Cloning and characterization of the lipase and lipase activator protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1678**(1):7-13.

- Sun B., Zhang X. H., Tang X., Wang S., Zhong Y., Chen J., et al. (2007).** A single residue change in *Vibrio harveyi* hemolysin results in the loss of phospholipase and hemolytic activities and pathogenicity for turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Bacteriol.* **189**(6):2575-2579.
- Szczesny P., Linke D., Ursinus A., Bär K., Schwarz H., Riess T. M., et al. (2008).** Structure of the head of the *Bartonella* adhesin BadA. *PLoS Pathog.* **4**(8):e1000119.
- Takeuchi H., Shibano Y., Morihara K., Fukushima J., Inami S., Keil B., et al. (1992).** Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase. *Biochem. J.* **281**(Pt 3):703-708.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**(12):2725-2729.
- Tang W. M. & Wong J. W. K. (1999).** Necrotizing fasciitis caused by *Vibrio damsela*. *Orthopedics* **22**(4):443-444.
- Tannaes T., Bukholm I. K. & Bukholm G. (2005).** High relative content of lysophospholipids of *Helicobacter pylori* mediates increased risk for ulcer disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **44**(1):17-23.
- Tatusova T., DiCucci M., Badretdin A., Chetvernin V., Ciufu S. & Li W. (2013).** *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*. The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174280/>
- Teo J. W., Zhang L. H. & Poh C. L. (2003).** Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* **312**:181-188.
- Teramura N., Tanaka K., Iijima K., Hayashida O., Suzuki Schmiel K., Hattori S., et al. (2011).** Cloning of a novel collagenase gene from the Gram-Negative bacterium *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B and its efficient expression in *Brevibacillus choshinensis*. *J. Bacteriol.* **193**(12):3049-3056.
- Terceti M. S., Ogut H. & Osorio C. R. (2016).** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the Black Sea: evidence of a multiclonal origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**(13):3736-3745.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Thanassi D. G., Stathopoulos C., Karkal A. & Li H. (2005).** Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review). *Mol. Membr. Biol.* **22**(1-2):63-72.
- Thomas S., Holland I. B. & Schmitt L. (2014).** The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**(8):1629-1641.
- Thompson C. C., Vicente A. C. P., Souza R. C., Vasconcelos A. T. R., Vesth T., Alves N., et al. (2009).** Genomic taxonomy of *Vibrios*. *BMC Evol. Biol.* **9**:258.
- Thyssen A., Grisez L., van Houdt R., & Ollevier F. (1998).** Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**(Pt 4):1145-1151.
- Tilley S. J. & Saibil H. R. (2006).** The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**(2):230-236.
- Titball R. W. (1998).** Bacterial phospholipases. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **84**:127-137.
- Tojo S., Satomura T., Matsuoka H., Hirooka K. & Fujita Y. (2011).** Catabolite Repression of the *Bacillus subtilis* FadR Regulon, Which Is Involved in Fatty Acid Catabolism. *J. Bacteriol.* **193**(10):2388-2395.
- Toker A. (2005).** The biology and biochemistry of diacylglycerol signalling. *EMBO Rep.* **6**(4):310-314.
- Travis J., Potempa J. & Maeda H. (1995).** Are bacterial proteinases pathogenic factors?. *Trends Microbiol.* **3**(10):405-407.
- Tyski S., Tylewska S., Hryniewicz W. & Jeljaszewicz J. (1987).** Induction of human neutrophils chemotaxis by staphylococcal lipase. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.* **265**(3-4):360-368.
- Upton C. & Buckley J. T. (1995).** A new family of lipolytic enzymes?. *Trends Biochem. Sci.* **20**(5):178-179.

- Uzun E. & Ogut H. (2015).** The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea. *Aquaculture* **437**:30-37.
- Vadas P., Browning J., Edelson J. & Pruzanski W. (1993).** Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J. Lipid Mediat.* **8**(1):1-20.
- Valeva A., Walev I., Weis S., Boukhallouk F., Wassenaar T. M., Endres K., et al. (2004).** A cellular metalloproteinase activates *Vibrio cholerae* pro-cytolysin. *J. Biol. Chem.* **279**(24):25143-25148.
- Valeva A., Walev I., Boukhallouk F., Wassenaar T. M., Heinz N., Hedderich J., et al. (2005).** Identification of the membrane penetrating domain of *Vibrio cholerae* cytolysin as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* **57**(1):124-131.
- Vallee B. L. & Auld D. S. (1990).** Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **29**(24):5647-5659.
- van den Berg B. (2010).** Crystal structure of a full-length autotransporter. *J. Mol. Biol.* **396**(3):627-633.
- van der Meer-Janssen Y. P., Van Galen J., Batenburg J. J. & Helms J. B. (2010).** Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog. Lipid Res.* **49**(1):1-26.
- van Kampen M. D., Rosenstein R. , Gotz F. & Egmond M. R. (2001).** Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1544** (1-2):229-241.
- Van Wart H. E. & Steinbrink D. R. (1981).** A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Anal. Biochem.* **113**(2):356-365.
- Van Wart H. E. & Steinbrink D. R. (1985).** Complementary substrate specificities of class-I and class-II collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* **24**(23):6520-6526.

- Vaseeharan B., Sundararaj S., Murugan T. & Chen J. C. (2007).** *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* associated with diseased black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius in India. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**(1):82-86.
- Vasil M. L., Stonehouse M. J., Vasil A. I., Wadsworth S. J., Goldfine H., Bolcome R. E., et al. (2009).** A complex extracellular sphingomyelinase of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits angiogenesis by selective cytotoxicity to endothelial cells. *PLoS Pathog.* **5**(5):e1000420.
- Vasua K. & Nagaraja V. (2013).** Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**(1):53-72.
- Vera P., Navas J. I. & Fouz B. (1991).** First isolation of *Vibrio damsela* from seabream (*Sparus aurata*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **11**:112-113.
- Verger R. (1997).** Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **15**(1):32-38.
- Vieira J. & Messing J. (1987).** Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**:3-11.
- Voulhoux R., Ball G., Ize B., Vasil M. L., Lazdunski A., Wu L. F., et al. (2001).** Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* **20**(23):6735-6741.
- Wandersman C. (1989).** Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* **3**(12):1825-1831.
- Wandersman C. & Delepelaire P. (2004).** Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:611-647.
- Wang R. F. & Kushner S. R. (1991).** Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**:195-199.
- Wang R. Z., Fang S., Wu D. L., Wu D., Lian J., Fan J. & et al. (2012).** Screening of a ScFv antibody that can neutralize effectively the cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* TLH. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(14):4967-4975.

- Wang X. H., Oon H. L., Ho G. W. P., Wong W. S. F., Lim T. M. & Leung K. Y. (1998).** Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiology* **144**(Pt 11):2987-3002.
- Watanabe K. (2004).** Collagenolytic proteases from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:520-526.
- Watnick P. I., Fullner K. J. & Kolter R. (1999).** A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* **181**(11):3606-3609.
- Weber T., Blin K., Duddela S., Krug D., Kim H. U., Bruccoleri R., et al. (2015).** antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* **43**(W1):1-7. <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>
- Wei Y., Schottel J. L., Derewenda U., Swenson L., Patkar S. & Derewenda Z. S. (1995).** A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat. Struct. Biol.* **2**(3):218-223.
- Wilhelm S., Rosenau F., Kolmar H. & Jaeger K. E. (2011).** Autotransporters with GDSL passenger domains: molecular physiology and biotechnological applications. *Chembiochem.* **12**(10):1476-1485.
- Wong S. K., Zhang X.-H. & Woo N. Y. S. (2012).** *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes. *Aquaculture* **330-333**:29-36.
- Wu L. N., Lin X. M., Wang F. P., Ye D. Z., Xiao X., Wang S. Y., et al. (2006).** OmpW and OmpV are required for NaCl regulation in *Photobacterium damsela*. *J. Proteome Res.* **5**(9):2250-2257.
- Yakushi T., Tajima T., Matsuyama S. & Tokuda H. (1997).** Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**(9):2857-2862.
- Yamaguchi K., Yu F. & Inouye M. (1988).** A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* **53**(3):423-432.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Yamamoto K., Ichinose Y., Shinagawa H., Makino K., Nakata A., Iwanaga M., et al. (1990).** Two-step processing for activation of the cytolysin/hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural gene (*hlyA*) and characterization of the processed products. *Infect. Immun.* **58**(12):4106-4116.
- Yamane K., Asato J., Kawade N., Takahashi H., Kimura B., & Arakawa Y. (2004).** Two cases of fatal necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela* in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **42**(3):1370-1372.
- Yanagase Y., Inoue, K., Ozaki M., Ochi T., Amano T. & Chazono M. (1970).** Hemolysins and related enzymes of *Vibrio parahaemolyticus* I. Identification and partial purification of enzymes. *Biken's Journal* **13**(2):77-92.
- Yeo H. J., Yokoyama T., Walkiewicz K., Kim Y., Grass S. & Geme J.W. (2007).** The structure of the *Haemophilus influenzae* HMW1 pro-piece reveals a structural domain essential for bacterial two-partner secretion. *J. Biol. Chem.* **282**(42):31076-31084.
- Yishan L., Jiaming F., Zaohe W. & Jichang J. (2011).** Genotype Analysis of Collagenase Gene by PCR-SSCP in *Vibrio alginolyticus* and its Association with Virulence to Marine Fish. *Curr. Microbiol.* **62**(6):1697-1703.
- Yoshihara K., Matsushita O., Minami J. & Okabe A. (1994).** Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase. *J. Bacteriol.* **176**(21):6489-6496.
- Yu M. S. & Lee C. Y. (1999).** Expression and characterization of the *prtV* gene encoding a collagenase from *Vibrio parahaemolyticus* in *Escherichia coli*. *Microbiology* **145**(Pt 1):143-150.
- Yu M. S., Yap M. N. & Lee C. Y. (2000).** Metal content and biochemical analyses of a recombinant collagenase PrtV from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* **44**(10):805-813.
- Yuen K. Y., Ma L., Wong S. S. Y. & Ng W. F. (1993).** Fatal necrotizing fasciitis due to *Vibrio damsela*. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**(5):659-661.

- Zhao D. H., Sun J. J., Liu L., Zhao H. H., Wang H. F., Liang L. Q., et al. (2009).** Characterization of two phenotypes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from diseased juvenile *Trachinotus ovatus* reared in cage mariculture. *J. World Aquacu. Soc.* **40**(2):281-289.
- Zhang X. H. & Austin B. (2005).** Haemolysins in *Vibrio* species. *J. Appl. Microbiol.* **98**(5):1011-1019.
- Zhang X. J., Qin G. M., Bing X. W., Yan B. L. & Bi K. R. (2011).** Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the cultured tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in China. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* **45**(1):1-13.
- Zhang Y. Z., Ran L. Y., Li C. Y. & Chen X. L. (2015).** Diversity, structures, and collagen- degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**(18):6098-6107.
- Zhong Y., Zhang X. H., Chen J., Chi Z., Sun B., Li Y., et al. (2006).** Overexpression, purification, characterization, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* hemolysin VHH. *Infect. Immun.* **74**(10):6001-6005.
- Zhou Y., Liang Y., Lynch K. H., Dennis J. J. & Wishart D. S. (2011).** PHAST: a fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Res.* **39**:347-352. <http://phast.wishartlab.com>
- Zitzer A., Bittman R., Verbicky C. A., Erukulla R. K., Bhakdi S., Weis S., et al. (2001).** Coupling of cholesterol and cone-shaped lipids in bilayers augments membrane permeabilization by the cholesterol-specific toxins streptolysin O and *Vibrio cholerae* cytolysin. *J. Biol. Chem.* **276**(18):14628-14633.
- Zückert W. R. (2014).** Secretion of bacterial lipoproteins: through the cytoplasmic membrane, the periplasm and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**(8):1509-1516.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Del presente trabajo derivan los siguientes artículos científicos:

- **Rivas A. J., Vences A., Lemos M. L. & Osorio C. R. (2015).** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors Dly, HlyA_{pl} and HlyA_{ch} are secreted via the type II secretion system. *Infect. Immun.* **83**(4):1246-1256.
- **Vences A., Rivas A. J., Lemos M. L., Husmann M. & Osorio C. R. (2017).** Chromosome-encoded hemolysin, phospholipase and collagenase, contribute to virulence for fish in plasmidless isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**:e00401-17.
- **Osorio C. R., Vences A., Matanza J. M. & Terceti M. S. (2018).** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a generalist pathogen with unique virulence factors and high genetic diversity. Minireview. *J. Bacteriol.* (en prensa).



